

[PDF-Version]

Aus der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. M. Einhäupl



DISSERTATION

**Das antioxidative System der Blut-Hirn-  
Schranke -  
Einfluß von Astrozyten sowie  
Hypoxie/Reoxygenierung**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae  
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité,  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Matthias Schroeter  
geb. am 22. Oktober 1965 in Döbeln

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dietel

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Heinemann

2. PD Dr. U. Dirnagl

3. PD Dr. J. E. Blasig

eingereicht: April 1998

Datum der Promotion: 26. 10. 1998

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn PD Dr. I. E. Blasig von mir selbst durchgeführt und ausgewertet worden und wurden mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BEO 021/0310015A/B) sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 507A2) unterstützt.

## **Verzeichnis verwendeter Abkürzungen und chemischer Formeln**

ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AP-1	Aktivator-Protein-1 (activator protein-1)
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Astrozyten
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
Cat	Catalase
cGPx	zytosolische GPx
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DTNB	5,5'-Dithio-bis[2-Nitrobenzoesäure]
DTT	Dithiothreitol
ECGF	endothelialer Wachstumsfaktor (endothelial cell growth factor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
EMSA	Gel-Elektromobilitätsshift-Assay (gel electrophoretic mobility shift assay)
ezSOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein, Marker der Astroglia (glial fibrillary acidic protein)
GKEZ	Gehirnkapillarendothelzellen
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochperformanz-Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)

IL	Interleukin
ILB-4	Isolectin B4, Marker der Mikroglia
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
MW	Mittelwert
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor- $\kappa$ B
NO $\cdot$	Stickstoffmonoxid
NOS	NO $\cdot$ -Synthase
$\cdot$ O $_2^-$	Superoxidanion
O4	Marker der Oligodendroglia
$\cdot$ OH	Hydroxylradikal
ONOO $^-$	Peroxynitrit
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PHGPx	Phospholipid-Hydroperoxid-GPx
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
RT	reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SOD	Superoxiddismutase
SOD1	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
SOD2	Mangan-Superoxiddismutase
SOD3	extrazelluläre Superoxiddismutase
TNB	2-Nitro-5-Thiobenzosäure
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
tPA	Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tissue plasminogen activator)
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist damit befaßt, den Einfluß von Astrozyten (AZ) auf die antioxidativen Schutzmechanismen von Gehirnkapillarendothelzellen (GKEZ) und mithin der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu klären. Als pathologische Prozesse wurden Hypoxie und Reoxygenierung in ihrer Wirkung auf das antioxidative Potential untersucht (Modell einer zerebralen Ischämie). Die Experimente wurden im wesentlichen an einem in vitro-Modell der BHS durchgeführt. Im folgenden sollen die Grundlagen der Untersuchungen dargestellt werden. Nach Ausführungen über die Struktur und Funktion der BHS (1.1.), die durch AZ beeinflusst werden (1.1.1.), wird auf die Prozesse bei Ischämie/Reperfusion im zentralen Nervensystem (ZNS) eingegangen (1.2.). Hierbei sind reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) von zentraler Bedeutung (1.2.1.-1.2.3.). ROS vermögen die BHS während Ischämie/Reperfusion bzw. Hypoxie/Reoxygenierung zu öffnen (1.3.). Im letzten Kapitel der Einleitung wird, ausgehend vom bisherigen Kenntnisstand, die Fragestellung der Arbeit entwickelt (1.4.).

### 1.1 Struktur und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Bereits Ehrlich (1902) und Goldmann (1913) beschrieben eine Schranke, die Blut- und Gehirnkompartment voneinander separiert. In die Blutbahn injizierte Farbstoffe, z. B. Trypanblau, führten zu keiner Färbung des Gehirns, im Gegensatz zu anderen Geweben (Betz et al., 1994). Diese BHS gewährleistet die normale nervale Funktion, indem sie homöostatische Verhältnisse in bezug auf Elektrolyte (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^{+}$ -Konzentration geringer extravasal als intravasal), Aminosäuren, Hormone und Neurotransmitter herstellt. GKEZ, welche die BHS bilden, unterscheiden sich in vivo von Endothelzellen anderer Organe. Zum Einen vermeiden kontinuierliche zonulae occludentes (tight junctions) die parazelluläre Bewegung polarer Moleküle. Zum Zweiten wird nichtregulierter transzellulärer Transport verhindert, indem keine Fenestrationsen oder transendothelialen Kanäle ausgebildet werden und die Anzahl plasmalemaler bzw. intrazellulärer Vesikel gering ist. Auf Grund dieser morphologischen Merkmale vermögen GKEZ Blut- und Gehirnkompartment voneinander abzugrenzen. In vivo werden GKEZ von einer Kollagen enthaltenden extrazellulären Matrix umgeben, in welche Perizyten eingebettet sind. Daran schließen sich die Endfüße von AZ-Ausläufern an, welche 90% der Oberfläche der vaskulären Zylinder bedecken (Abb. 1.1; Anhang) und nur 0,4 nm von der Membran der GKEZ entfernt sind (Pardridge, 1991). Diese morphologische Nähe von GKEZ und AZ führte

zur Annahme funktioneller Einflüsse von AZ auf GKEZ, welche unter anderem in Kokultur-Systemen aus GKEZ und AZ in vitro untersucht werden können.

### 1.1.1 Einfluß von Astrozyten auf die Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die beschriebenen funktionellen Einflüsse von AZ auf GKEZ. Dabei wurde bei verschiedenen Effekten auch die Spezifität der Interaktion von GKEZ und AZ untersucht. Fibroblasten und Muskelzellen waren dabei ohne Einfluß auf GKEZ; teilweise waren nur GKEZ und keine anderen Endothelzellen von AZ beeinflussbar (Cancilla et al., 1993).

**Tab. 1.1** Einfluß von AZ auf typische Eigenschaften von GKEZ.

Induktion von	Effektor	Referenz
verminderter Permeabilität	kokultivierte C6-Glioma-Zellen/AZ	Raub, 1996; Mertsch et al., 1997
erhöhtem transendothelialen elektrischen Widerstand	kokultivierte AZ/C6-Glioma-Zellen	Cancilla et al., 1993; Giese et al., 1995
tight junctions	AZ-konditioniertes Medium, kokultivierte AZ	Cancilla et al., 1993
$\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase	AZ/C6-Glioma-Zellen-konditioniertes Medium, kokultivierte AZ	
Transportsystem für neutrale Aminosäuren (A-, Alanin-System; abluminale Membran)	kokultivierte AZ	
Transportsystem für Glukose (carrier-vermittelt oder erleichterte Diffusion)	AZ/C6-Glioma-Zellen-konditioniertes Medium	
gehirnspezifischem Glukosetransporter GLUT-1	kokultivierte AZ	Hayashi et al., 1997
Transferrin-Rezeptor	kokultivierte AZ (mit morphologischem Kontakt)	
P-Glykoprotein (luminale Membran)	kokultivierte AZ (mit morphologischem Kontakt)	
Na-K-Cl-Kotransporter	Interleukin-6 aus kokultivierten C6-Glioma-Zellen, C6-Glioma-Zellen-konditioniertem Medium	Sun et al., 1997
$\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (abluminale Membran)	kokultivierte C6-Glioma-Zellen	Cancilla et al., 1993
alkalischer Phosphatase	AZ-konditioniertes Medium, kokultivierte AZ, Interleukin-6 aus Glioma-Zellen-konditioniertem Medium	Cancilla et al., 1993 Takemoto et al., 1994
Mitochondrien	kokultivierte AZ (mit morphologischem Kontakt)	Hayashi et al., 1997
Vaskularisierung	kokultivierte AZ VEGF aus AZ (in vivo)	Cancilla et al., 1993 Lattera et al., 1993 Stone et al., 1995

(VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; vascular endothelial growth factor)

Andererseits ist die Wechselwirkung nicht einseitig, GKEZ vermögen ebenso in AZ spezifische Reaktionen hervorzurufen: So senden GKEZ ein chemotaktisches Signal aus, das zu einer Migration von AZ in die Richtung aus GKEZ gebildeter gefäßartiger Strukturen führt (Cancilla et al., 1993). Im Gegensatz zur Annahme einer unidirektionalen Einwirkung von AZ auf GKEZ muß von einer zirkulären Interaktion zwischen GKEZ und AZ ausgegangen werden.

## 1.2 Zerebrale Ischämie - Generierung und Abbau freier Radikale

Im folgenden sollen pathologische Prozesse im ZNS (im besonderen zerebrale Ischämie/Reperfusion) dargestellt werden, welche mit Störungen der Homöostase zwischen Bildung und Abbau von ROS als einem wesentlichen Aspekt der multifaktoriellen Genese verbunden sind. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über diese Erkrankungen (Jesberger und Richardson, 1991; Cadet et al., 1996; Löschmann und Schulz, 1997; Knight, 1997; Mattson, 1997).

**Tab. 1.2** Erkrankungen des ZNS mit gestörtem Radikal-Metabolismus.

Krankheit	Mechanismus
Amyotrophe Lateralsklerose	familiärer Typ: Mutationen im CuZnSOD-Gen führen zu reduzierter Aktivität
Demenz vom Alzheimer-Typ	unklar; erhöhter oxidativer Streß: vermindertes antioxidatives Potential, $\beta$ -Amyloid führt zur Bildung von ROS, bei familiärer Demenz vom Alzheimer-Typ Gendefekt auf Chromosom 21 (CuZnSOD beteiligt?), mis-sense-Mutation in mitochondrialer DNA mit reduzierter Cytochrom-c-Oxidase Aktivität (verstärkte Generierung ROS?)
Down-Syndrom	durch Trisomie 21 Überexpression CuZnSOD
Mitochondriale Enzephalopathie	unklar; Mutationen in mitochondrialer DNA durch ROS?
Multiple Sklerose	unklar (LPO des Myelins?); LPO erhöht, Fe-Chelatoren vermindern Progression der Krankheit
Morbus Parkinson	unklar; erhöhte LPO, erniedrigte Aktivität von GPx, Cat, SOD, verminderter GSH-Gehalt in substantia nigra, Monoaminoxidase bildet $H_2O_2$
Morbus Huntington	unklar; Reduktion der Atmungskettenfunktion, oxidative DNA-Schädigung, therapeutische Erfolge mit Antioxidantien
Ischämie/Reperfusion (sowie vaskuläre Demenz)	siehe im Text
Schädel-Hirn-Trauma-induzierte Epilepsie	unklar; LPO von Membranen?
Schizophrenie	unklar; im Katecholamin-Metabolismus erzeugte ROS stören Neurotransmission an dopaminergen Synapsen?
Spätdyskinesie (tardive dyskinesia)	durch Neuroleptika induzierte LPO führt zu Schädigung von Neuronen
Methamphetamin-Mißbrauch	$\cdot O_2^-$ -vermittelte Neurotoxizität (transgene Mäuse, die CuZnSOD überexprimieren, zeigen geringere Empfindlichkeit)

(LPO = Lipidperoxidation; weitere Abkürzungen siehe 1.2.2.)

Einige dieser Erkrankungen sind mit einer radikalbedingten Störung der BHS verbunden. So konnten Blanc et al. (1997) im Falle des Morbus Alzheimer zeigen, daß Amyloid  $\beta$ -Peptid zu einem Anstieg der Permeabilität von Albumin durch Endothelzell-Monolayer, apoptotischem Zelltod und einem beeinträchtigten Glukose-Transport führt. Außerdem verursacht  $\beta$ -Amyloid eine endotheliale Dysfunktion in zerebralen Arterien (verstärkte Vasokonstriktion auf Serotonin sowie verminderte Vasodilatation auf Azetylcholin und Bradykinin; Price et al., 1997). In beiden Studien konnten die beobachteten Effekte mittels Antioxidantien vermindert werden, was auf ROS als Mediatoren der Schädigung hinweist.

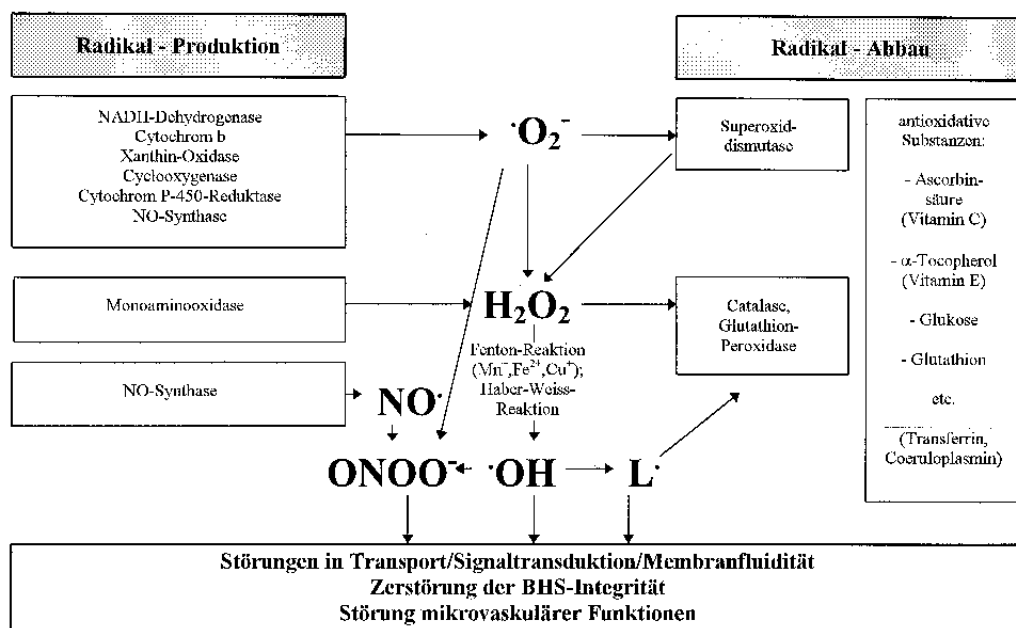
Die zerebrale Ischämie, eine prototypische Erkrankung des ZNS, hat von den erwähnten Erkrankungen neben der Demenz vom Alzheimer-Typ die größte epidemiologische Bedeutung. Der Schlaganfall (von dem 85% auf Ischämien, der Rest auf Hämorrhagien zurückzuführen ist) steht nach Herzkrankheiten und malignen Tumoren an dritter Stelle der Todesursachen in den zivilisierten Ländern. 10% der über 50 Jahre alten Deutschen sterben an einem Gefäßinsult (Poeck, 1990). Jedes Jahr werden in den USA 400.000 Patienten nach einem Schlaganfall aus dem Krankenhaus entlassen (Kistler et al., 1991). Die besondere Vulnerabilität des zerebralen Gewebes gegenüber Ischämie ist durch fehlende Sauerstoff- und Glukosevorräte sowie einen respiratorischen Quotienten von nahezu 1 bedingt. Der Energiebedarf des Gehirns wird fast ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung gedeckt. Demzufolge kommt es bei Ischämie zu einem raschen Funktionsausfall von Neuronen. Nach 30 bis 40 s sinkt die Aktivität im Elektroenzephalogramm bei globaler Ischämie. Nach 4 bis 5 min treten die ersten Nekrosen an Ganglienzellen auf (Poeck, 1990; Dirnagl und Meisel, 1998).

### **1.2.1 Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies**

Die durch Ischämie hervorgerufenen metabolischen Veränderungen laufen in den Zelltypen des ZNS ähnlich ab. Hier soll im wesentlichen auf die Zellen der BHS, GKEZ und AZ, eingegangen werden. Der Energiemangel führt zu einer Abnahme des Gehaltes an Adenosintriphosphat (ATP) sowie einem intrazellulären Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$ , welches wiederum Enzymsysteme aktiviert (Proteinkinase C, Proteasen, Endonukleasen, NO-Synthase [NOS], Phospholipasen). Daraus resultieren Proteolyse, Proteinphosphorylierung, DNA-Fragmentierung und Membranabbau. Glutamat wird



freigesetzt (Exzitotoxizität) und verstärkt die Schadenskaskade im Sinne eines circulus vitiosus (Mertsch et al., 1995; Dirnagl und Meisel, 1998).



(NADH = Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid)

**Abb. 1.2** Bildung und Abbau von freien Radikalen, wie z. B. während Ischämie/Reper-fusion (bzw. Hypoxie/Reoxygenierung) in GKEZ.

In diesem Prozeß werden ROS gebildet (Abb. 1.2), wobei dies im wesentlichen in der Reperfusionsphase stattfindet (oxidative burst). Eine Hauptquelle von  $\text{O}_2^-$  ist unter diesen Bedingungen in makrovaskulären Endothelzellen die Xanthin-Oxidase (Zweier et al., 1994), welche bereits unter physiologischen Bedingungen eine 20 bis 25fach höhere Aktivität in GKEZ als in Hirnhomogenat besitzt (Terada et al., 1991). Xanthin-Oxidase wird in GKEZ während der Ischämie zusätzlich durch Proteolyse (Protease Calpain) bzw. Oxidierung einer Sulfhydrylgruppe aus Xanthin-Dehydrogenase gebildet. Ebenso wird mit dem Arachidonsäure-Metabolismus die Cyclooxygenase 2 aktiviert (Schmedtje et al., 1997). Neben diesen beiden Enzymen generieren auch die in den Mitochondrien lokalisierte NADH-Dehydrogenase und der Ubiquinon-Komplex des Cytochrom b sowie das mikrosomale Cytochrom-P-450-System  $\text{O}_2^-$  (Matsuyama, 1996). Monoaminoxidase, ein Segment der 'enzymatischen BHS', ist zur Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Lage.

$\text{H}_2\text{O}_2$  kann mit  $\text{O}_2^-$  (Haber-Weiss-Reaktion) bzw. in Anwesenheit von Metallen (Fenton-Reaktion) weiter zu  $\text{OH}$  reagieren.  $\text{NO}$  und  $\text{O}_2^-$  reagieren zu  $\text{ONOO}^-$ . Die Haber-Weiss- und Fenton-Reaktion werden durch einen geringen Transferrin- und

Coeruloplasmin-Gehalt in der extrazellulären Flüssigkeit des Hirngewebes begünstigt (Betz, 1993). GKEZ besitzen im Unterschied zu Endothelzellen anderer Gewebe eine große Anzahl von Transferrin-Rezeptoren als Teil eines Transzytose-Systems, das die Aufnahme von Eisen in das Gehirn bewirkt.  $\cdot\text{O}_2^-$  vermittelt die Reduktion und die Freisetzung von Eisen in den GKEZ, welches die Bildung von  $\cdot\text{OH}$  katalysieren kann (Betz, 1993).  $\cdot\text{OH}$  und  $\text{ONOO}^-$  können als die hauptsächlich schädigenden freien Radikale betrachtet werden, da sie sehr reaktiv sind und verschiedene biologisch wichtige Moleküle zu oxidieren vermögen.  $\cdot\text{OH}$  kann zur Bildung von Lipidradikalen ( $\text{L}^\cdot$ ) führen und mithin eine gesteigerte Lipidperoxidation initiieren (Bromont et al., 1989; Betz, 1993). Die Radikalbildung wird in der Ischämie durch die Gewebeazidose unterstützt (Dirnagl und Meisel, 1998).

Für Endothelzellen wurde die Produktion von ROS wie  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\cdot\text{OH}$  während Hypoxie/Reoxygenierung nachgewiesen (Michiels et al., 1992; Kondo et al., 1996b; Kumar et al., 1996; Terada, 1996; Mertsch et al., 1997). AZ generieren ROS ebenfalls nach Hypoxie (Hori et al., 1994) jedoch später als GKEZ (Kondo et al., 1996b). Eine zusätzliche Quelle freier Radikale stellen Neutrophile dar, welche nach Aktivierung durch Ischämie  $\cdot\text{O}_2^-$  mittels Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat- (NADPH-) Oxidase bilden (respiratory burst). Neutrophile durchdringen im Rahmen inflammatorischer Prozesse bei Ischämie die BHS und können diese zusätzlich schädigen (Betz, 1993).

### 1.2.2 Abbau von reaktiven Sauerstoff-Spezies

Da bereits unter physiologischen Zuständen ca. 5% des metabolisierten  $\text{O}_2$  zu  $\cdot\text{O}_2^-$  konvertiert werden, müssen biologische Systeme mit wirksamen antioxidativen Systemen ausgestattet sein, die den Abbau von ROS ermöglichen (Betz, 1993; Abb. 1.2). Dieses antioxidative System besteht aus den folgenden Enzymen/antioxidativen Substanzen:

1. Superoxiddismutasen (SOD; EC 1.15.1.1) disproportionieren  $\cdot\text{O}_2^-$  und kommen in Eukaryonten in drei verschiedenen Isoformen vor (SOD1, zytosolische CuZnSOD; SOD2, mitochondriale MnSOD [Matrix]; SOD3, extrazelluläre ezSOD). Während die CuZnSOD und MnSOD sowohl in GKEZ als auch in AZ exprimiert werden, wurde die Sekretion von ezSOD nur für AZ, jedoch nicht Endothelzellen gezeigt (Marklund, 1990). Die CuZnSOD hat mit einer Halbwertszeit von 6-10 Minuten eine deutlich

kürzere Lebensdauer als die MnSOD mit 5-6 Stunden (Gorecki et al., 1991). MnSOD ist teilweise auch zytosolisch nachweisbar, was durch eine fehlende Mitochondrieneintrittssequenz bei Überexpression bedingt sein könnte (Nishida et al., 1993; Kühl, 1996).

2. Catalase (Cat; EC 1.11.1.6) metabolisiert  $H_2O_2$  und ist in den Peroxisomen lokalisiert. Cat ist an der BHS in den die Gefäße bedeckenden Endfüßen der AZ konzentriert, in GKEZ dagegen immunohistochemisch nicht nachweisbar (Moreno et al., 1995).
3. Glutathion-Peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) baut  $H_2O_2$  sowie Peroxide ab und benötigt dabei reduziertes Glutathion als Ko-Substrat. Vier Isoformen der GPx sind bekannt (Ursini et al., 1995). Die zytosolisch (c) sowie mitochondrial in der Matrix lokalisierte cGPx metabolisiert Hydroperoxide außer Hydroperoxiden komplexer Lipide (Flohé, 1989; Panfili et al., 1991). Die Phospholipid-Hydroperoxid-GPx (PHGPx) baut neben Hydroperoxiden geringen Molekulargewichts ebenfalls Hydroperoxide komplexer Lipide und von Cholesterol ab (Thomas et al., 1990). Weiterhin wurden eine extrazelluläre oder Plasma-GPx (Yamamoto und Takahashi, 1993) sowie die gastrointestinale GPx (Chu et al., 1993) beschrieben. Von diesen Isoformen scheinen nur die cGPx und die PHGPx in den Zellen der BHS vorzukommen. Während Damier et al. (1993) eine Beschränkung der GPx-Immunoreaktivität im Gehirn auf AZ berichteten, konnten Jornot und Junod (1995) cGPx in Endothelzellen in vitro nachweisen.
4. Weiterhin zählen zum antioxidativen System unspezifische antioxidative Substanzen wie Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol, Glukose und Glutathion.

Shukla et al. (1995) konnten zeigen, daß isolierte zerebrale mikrovaskuläre Gefäße der Ratte im Vergleich mit Hirnhomogenat eine höhere Aktivität antioxidativer Enzyme aufweisen (Cat war 3,5fach, GPx und Glutathion-Reduktase 2fach höher; SOD war vergleichbar). Dieser Befund verdeutlicht die Bedeutung der antioxidativen Systeme für die BHS. Obwohl GKEZ und AZ in ihrem antioxidativen Potential bisher nicht verglichen wurden, ist ein relativ hohes antioxidatives Potential von AZ im Vergleich zu Neuronen/Oligodendroglia bekannt (Copin et al., 1992; Dringen und Hamprecht, 1997; Juurlink, 1997). Demgemäß konnten Desagher et al. (1996) sowie Lucius und Sievers (1996) beobachten, daß AZ Neurone vor oxidativem Streß

schützen können.

Während Ischämie/Reperfusion bzw. Hypoxie/Reoxygenierung kommt es in der Regel zu einer Abnahme des antioxidativen Potentials (Plateel et al., 1995; Rabin et al., 1996). Eine mögliche Ursache sind vermehrt gebildete ROS. So kann  $\cdot\text{O}_2^-$  die Enzyme Cat und GPx inaktivieren (Kono und Fridovich, 1982; Kühl, 1996).  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$  können CuZnSOD inaktivieren, jedoch nicht MnSOD (Sinet und Garber, 1981).

Eine Sonderstellung nimmt die MnSOD ein. Diese ist auf vielfältige Weise induzierbar (ionisierende Strahlung,  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Zytokine, z. B. Tumor-Nekrose-Faktor [TNF], Interleukin [IL]-1, Interferon- $\gamma$ ; Wong, 1995; Kühl, 1996; Pinteaux et al., 1996). Im Falle der amyotrophen Lateralsklerose (Blaauwgeers et al., 1996) bzw. des Menkes-Syndrom (Menkes' kinky hair disease; Shibata et al., 1995) kann eine wahrscheinlich kompensatorische Induktion dieses Enzyms beobachtet werden. Diese leichte Induzierbarkeit der MnSOD ist prophylaktisch bzw. therapeutisch nutzbar (Präkonditionierung; Ohtsuki et al., 1992; Matsuyama, 1996). Eine Überexpression von MnSOD in transgenen Mäusen bewirkt eine Reduktion der Infarktgröße und Lipidperoxidation nach Verschluss der mittleren zerebralen Arterie. MnSOD überexprimierende Phäochromozytom-Zellen zeigten nach Inkubation mit ROS generierenden Substanzen geringere Apoptose (Keller et al., 1998). Überexpression von CuZnSOD führt ebenfalls zur Reduktion der Infarktgröße sowie Aufrechterhaltung des normalen Gehaltes von antioxidativen Substanzen wie Ascorbinsäure und reduziertem Glutathion nach fokaler Ischämie (Kinouchi et al., 1991; Hurn et al., 1996). Wird dagegen das MnSOD-Gen in Mäusen ausgeschaltet (Knock-out), kommt es unter anderem zu einer Degeneration von Neuronen in den Basalganglien und im Hirnstamm mit fortschreitenden motorischen Störungen. Diese Mäuse sterben bereits nach 3 Wochen (Lebovitz et al., 1996). Dies sind weitere Hinweise für die Bedeutung der MnSOD.

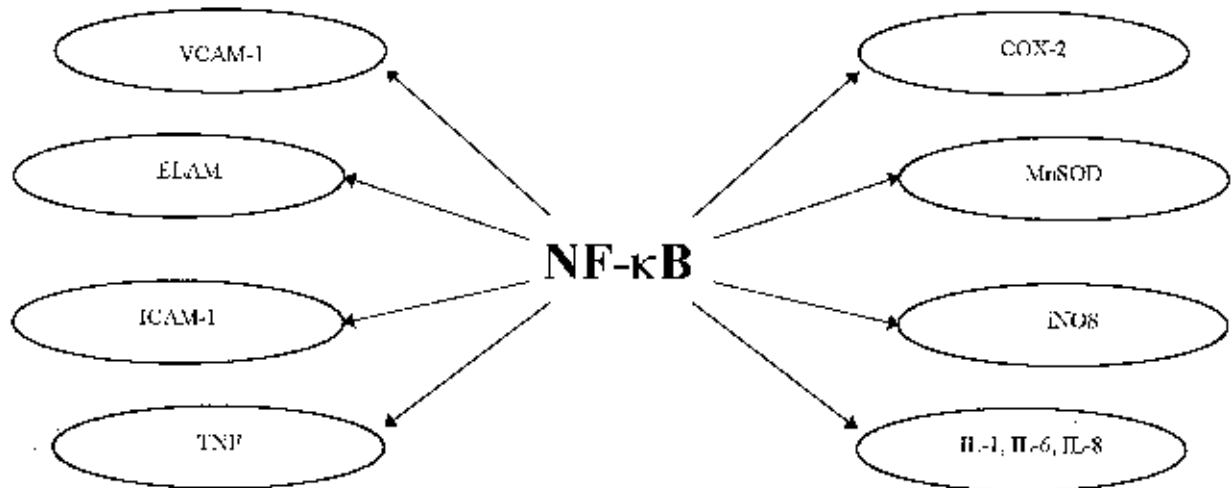
### **1.2.3 Signaltransduktion und freie Radikale - der nukleäre Faktor- $\kappa\text{B}$**

Bisher wurde nur die destruktive Wirkung von ROS dargestellt. ROS sind andererseits an der Signaltransduktion bei vielfältigen Prozessen beteiligt: Wirkung und Sekretion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen; Apoptose und Transkription. ROS können ebenso den Ionen-Transport durch Kanäle beeinflussen (Lander, 1997). Hier soll nur ein Beispiel für die regulatorische Funktion von ROS auf transkriptionaler Ebene dargestellt werden, die Regulation der Bindungsaktivität des

nukleären Faktors- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

Das Aktivator-Protein-1 (AP-1) und NF- $\kappa$ B sind Transkriptionsfaktoren, die in Abhängigkeit vom Redoxpotential der Zellen reguliert werden. Dabei hat NF- $\kappa$ B in GKEZ und AZ die größere Bedeutung. NF- $\kappa$ B spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von GKEZ, wie sie z. B. im Rahmen eines Reperfusionsschadens stattfindet (Ferran et al., 1995). Die Aktivierung von AZ (wie bei Gliosis) scheint, im Gegensatz zu der von Neuronen oder Mikroglia, ebenfalls über eine Erhöhung der Bindungsaktivität dieses Transkriptionsfaktors vermittelt zu sein (Pennypacker, 1997).

NF- $\kappa$ B ist ein als Heterodimer (meist p50/p65, RelA) vorliegender Transkriptionsfaktor, der im Zytoplasma an das spezifische inhibitorische Protein I $\kappa$ B gebunden vorliegt. Wird I $\kappa$ B durch Kinasen phosphoryliert, gelangt NF- $\kappa$ B in den Nukleus und bindet an cis-Elemente derjenigen Gene, die eine Bindungsregion für NF- $\kappa$ B enthalten. Da keine Neusynthese erforderlich ist, erfolgt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B auf einen Stimulus sehr schnell (wenige min). Während Ischämie/Reperfusion können verschiedene Faktoren zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen: Inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1; ROS, im besonderen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Reoxygenierung (Müller et al., 1997); Neurotransmitter wie Glutamat (O'Neill und Kaltschmidt, 1997) sowie in Endothelzellen Scherstreß (Lan et al., 1994). Schmedtje et al. (1997) berichteten einen Anstieg der Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in Endothelzellen während Hypoxie. Alle diese Stimuli können für GKEZ bzw. AZ relevant sein. NF- $\kappa$ B beeinflusst die Transkription vieler Gene (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3** Wirkung von NF- $\kappa$ B auf die Transkription verschiedener Gene. Vaskuläres Zell-Adhäsions-Molekül-1 (VCAM-1), Epitheliales Leukozyten-Adhäsions-Molekül (ELAM), Interzelluläres Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1), Cyclooxygenase-2 (COX-2), induzierbare NOS (iNOS) (Morishita et al., 1997; O'Neill und Kaltschmidt, 1997).

Die Wirkung von NF- $\kappa$ B im Rahmen eines ischämischen Insultes wird kontrovers diskutiert. Einerseits soll NF- $\kappa$ B neuroprotektiv wirken, konnten doch Bruce et al. (1996) in einer TNF-Rezeptor (p55/p75)-knock-out Maus eine Verstärkung der Folgen einer zerebralen Ischämie zeigen. Andererseits deuten Experimente, welche die Folgen einer Hemmung von NF- $\kappa$ B bei einer myokardialen Ischämie untersuchten, eine eher destruktive Wirkung dieses Transkriptionsfaktors an. Morishita et al. (1997) konnten mit NF- $\kappa$ B-decoy (-'Köder'), die NF- $\kappa$ B binden und inaktivieren, eine Reduktion des Infarktgebietes erreichen. Dieses Ergebnis könnte auch für den Reperfusionsschaden im ZNS relevant sein, da NF- $\kappa$ B die Adhäsion von Leukozyten und Makrophagen an GKEZ vermittelt. Auf eine neurodestruktive Wirkung von NF- $\kappa$ B deuten weiterhin Befunde, die durch eine Inaktivierung von NF- $\kappa$ B mit Azetylsalizylsäure eine Neuroprotektion in einem Glutamat-Exzitotoxizitätsmodell erreichten (O'Neill und Kaltschmidt, 1997). Da die wesentliche Eigenschaft der BHS ihre Dichtheit ist, soll im nächsten Kapitel die Funktion der BHS während Ischämie/Reperfusion betrachtet werden.

### 1.3 Funktion der Blut-Hirn-Schranke während Ischämie/Reperfusion

In Abbildung 1.2 sind die mit ROS in Zusammenhang gebrachten Schädigungen der BHS summarisch zusammengefaßt. Neben diesen kurzfristigen Schädigungen kommt es ebenfalls zu verzögerten Schäden durch Apoptose (Bonfoco et al., 1995; Plateel et al., 1995; Du et al., 1996).

Ein wesentliches Kriterium der BHS-Funktion ist die Dichtheit der BHS. Diese kann *in vitro* mittels transendothelialelektrischen Widerstand sowie *in vitro* und *in vivo* mittels Permeabilität (z. B. für Evan's Blau, markiertes Albumin, Fluoreszein, Harnstoff, Na<sup>+</sup>) gemessen werden (Zuckerman et al., 1994; Giese et al., 1995; Inoue et al., 1996b). *In vivo* soll eine Öffnung der BHS und die Störung der mikrovaskulären Funktion eher im Falle der lokalen als der globalen Ischämie (mit Ausnahme des Gerbil) eine Rolle spielen (Siesjö et al., 1995).

Während Ischämie/Reperfusion *in vivo* wurde eine zweiphasige Öffnung der BHS berichtet (Baethmann et al., 1991), die zur Ausbildung eines vasogenen Ödems führt. Das in der frühen Ischämie (nach Sekunden bis Minuten) auftretende, zytotoxische Ödem steht dagegen nicht mit einer Schädigung der BHS in Zusammenhang. Dieses frühe Ödem ist intrazellulär lokalisiert, reversibel und durch Elektrolyt-Verschiebungen (ATP-Mangel) bedingt. Bei kurzer Ischämie kommt es erst in der frühen Reperusionsphase, mit der postischämischen Hyperperfusion, zur ersten Öffnung der BHS. Die zweite Erhöhung der Schrankenpermeabilität folgt nach vielen Stunden. Mit der Öffnung der BHS wird die Entstehung des vasogenen, extrazellulären Ödems eingeleitet. Bei länger anhaltender Ischämie tritt die Schädigung der BHS bereits in der Ischämie auf. Prinzipiell hat das Ödem nach arteriellem Verschuß seinen Höhepunkt nach 2 bis 3 Tagen erreicht und bildet sich dann wieder zurück (Baethmann et al., 1991). Ursache des vasogenen Ödems ist die Extravasation von Proteinen (z.B. Albumin), Plasma-Filtrat und anderen Molekülen in das extrazellulär-extravasale Kompartiment (Farooqui et al., 1994). Durch Steigerung des intrakraniellen Druckes kann es zur vaskulären Kompression und Herniation von Hirngewebe kommen, was die häufigste Ursache der Frühmortalität bei zerebraler Ischämie darstellt (Baethmann et al., 1991).

Martz et al. (1989) untersuchten den Einfluß von ROS auf die Permeabilität der BHS nach fokaler Ischämie/Reperfusion bei der Ratte. Die Applikation von Allopurinol, einem Hemmer der Xanthin-Oxidase, führte zu einer Verkleinerung des Hirnödems und des ischämischen Gebietes sowie einem Schutz der BHS nach 3 h Ischämie. In Modellen globaler zerebraler Ischämie wurden ähnliche Resultate gefunden. Zuckerman et al. (1994) berichteten, daß nach 20 min globaler zerebraler Ischämie und 2 h Reperfusion bei Schweinen die Permeabilität der BHS im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht war. Eine Vorbehandlung mit SOD, Cat oder Indomethazin konnte die

Erhöhung der Permeabilität vermindern, was auf ROS als Mediatoren hinweist. Takeda et al. (1993) und Inoue et al. (1996b) konnten bei Hunden eine Öffnung der BHS bereits nach 18 min globaler Ischämie und 30 min Reperfusion beobachten. Durch Applikation von modifizierter SOD mit hoher Affinität zu Albumin ( $t_{1/2}$  6-8 h im Gegensatz zu 5 min bei nativer SOD) konnten der Anstieg der BHS-Permeabilität, das konsekutive Hirnödem, die Hypoperfusion in der späten Reperfusion und neurologische Defizite vermieden werden.

Entsprechende Resultate wurden auch in vitro erhalten. Nach Hypoxie/Reoxygenierung nahm die Permeabilität von Monolayern aus pulmonalen Endothelzellen für Albumin zu, was durch CuZnSOD und Cat verhindert werden konnte (Lum et al., 1992). Ähnliches wurde auch für ein in vitro-Kokultur-Modell der BHS aus GKEZ und AZ gezeigt. Das Lazaroid U83836E konnte die Dichtheit während Hypoxie/Reoxygenierung aufrechterhalten (Giese et al., 1995; Mertsch et al., 1997), was die durch ROS induzierte Membran-Lipidperoxidation als Ursache für die Schädigung der BHS wahrscheinlich macht.

Einerseits wird aus diesen Ergebnissen deutlich, daß ROS die BHS während Ischämie/Reperfusion bzw. Hypoxie/Reoxygenierung zu öffnen vermögen. Andererseits stellen sich Möglichkeiten zur pharmakologischen Intervention während oder nach einer zerebralen Ischämie dar. Momentan werden große Anstrengungen zur Erforschung therapeutischer Möglichkeiten bei dieser Erkrankung unternommen. Dabei sind die bisherigen Bemühungen im wesentlichen auf den Schutz der Neurone gerichtet. Die Zellen der BHS werden weitgehend vernachlässigt.

Die Benennung des Schlaganfalls als 'brain attack' im angloamerikanischen Raum macht einen Paradigmenwechsel (Kuhn, 1988) deutlich. Patienten mit zerebraler Ischämie werden ähnlich Patienten mit Myokard-Infarkt (heart attack) als therapierbarer Notfall betrachtet, während bis vor einigen Jahren die Auffassung einer sehr beschränkten Therapierbarkeit vorherrschte. Durch Information der Bevölkerung erreichen Patienten zeitiger spezialisierte Einrichtungen (stroke units). Die Möglichkeiten rationaler pharmakologischer Behandlung sind jedoch noch beschränkt.

Bisher existiert für Patienten mit zerebraler Ischämie keine allgemein akzeptierte



Standardtherapie. Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über die bisher klinisch untersuchten Substanzen.

**Tab. 1.3** Klinisch untersuchte Pharmaka zur Behandlung der zerebralen Ischämie.

Substanz	Bemerkungen	Referenz
Antikoagulation/Thrombolyse -Heparinoide Antikoagulantien -tPA -Streptokinase -Prourokinase -Urokinase	erfolgreich erfolgreich innerhalb 3 h Nebenwirkungen (Hämorrhagien) Nebenwirkungen (Hämorrhagien) Nebenwirkungen (Hämorrhagien)	NINDS-Studie (1995), Koroshetz und Moskowitz (1996), Gass (1997), Ryan et al. (1997)
Glutamat-Rezeptor-Antagonisten -NMDA-Antagonisten -AMPA-Antagonisten	hohe Nebenwirkungsrate (Psychose, neuronale Vakuolisierung) noch kein Ergebnis	
Radikalfänger wie -Tirilazad (U74006F, 21-Aminosteroid=Lazaroid) -Pergorgotein (Polyethylenglykol-SOD)	noch kein Ergebnis erfolgreich bei Schädel-Hirn-Trauma	
Blocker der Adhäsion von Leukozyten an GKEZ -Enlimomab (Anti ICAM-1 Antikörper) -Anti CD-11 Antikörper	noch kein Ergebnis	
Blocker spannungsgesteuerter Kanäle -Na <sup>+</sup> -Kanal-Blocker -Ca <sup>++</sup> -Kanal-Blocker	noch kein Ergebnis bzw. ohne positiven Effekt (Nimodipin)	
Neurotrophine -bFGF-Agonist	noch kein Ergebnis	
GABA-Rezeptor-Agonisten -Chloromethiazol	noch kein Ergebnis	
Membranstabilisatoren -Phospholipid-Präkursor Citicholin	noch kein Ergebnis	

(AMPA =  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat; bFGF = basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor, basic fibroblast growth factor; GABA =  $\gamma$ -Aminobuttersäure,  $\gamma$ -aminobutyrate; NMDA =

N-Methyl-D-Aspartat; tPA = Gewebe-Plasminogen-Aktivator, tissue plasminogen activator)

Die therapeutischen Ansätze richten sich im besonderen auf den Schutz des funktionell, aber nicht strukturell geschädigten Gewebes (Penumbra) in der Randzone des Infarktes. Zwei therapeutische Strategien werden verfolgt: Einerseits die Wiederherstellung einer physiologischen Durchblutungssituation und andererseits zytoprotektive Maßnahmen. Bisher wurde nur Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tissue plasminogen activator; tPA) in den USA zum klinischen Einsatz bei akutem ischämischen Schlaganfall innerhalb von 3 h zugelassen.

Prinzipiell ist die Therapie mit Antikoagulantien/Thrombolytika mit der Gefahr von zerebralen Hämorrhagien als Nebenwirkung verbunden. In einer Studie des Nationalen Institutes für neurologische Erkrankungen und Schlaganfall (USA) wurde ein signifikanter Anstieg von symptomatischen intrazerebralen Blutungen in den ersten 36 h berichtet (NINDS, 1995). Die klinischen Versuche mit anderen Thrombolytika mußten auf Grund dieser Nebenwirkungen abgebrochen werden. Hier erscheint eine Kombination mit Pharmaka möglich, die in der Reperfusion die BHS zu schützen vermögen und mithin intrazerebrale Blutungen verringern bzw. vermeiden könnten. Bisher wurden Kombinationstherapien jedoch nur sehr selten klinisch getestet. Auf eine mögliche Bedeutung von Glutamat-Antagonisten für die BHS während Hypoxie/Reoxygenierung wurde durch Giese et al. (1995) hingewiesen, die einen protektiven Effekt von MK-801 (nicht-kompetitiver NMDA- [N-Methyl-D-Aspartat]-Rezeptor-Antagonist) in einem Kokultur-Modell (GKEZ und AZ) beobachteten. Die klinisch geprüften Radikalfänger Tirilazad und SOD (Pergorgotein) wirken im wesentlichen in den Gefäßen (Koroshetz und Moskowitz, 1996), zumal gezeigt wurde, daß Aorta-Endothelzellen mit Polyethylenglykol modifizierte SOD und Cat aufnehmen und dadurch das antioxidative Potential steigern können (Beckman et al., 1988). Die Blocker von Adhäsionsmolekülen werden ebenso an den GKEZ wirksam, da Ischämie/Reperfusion zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zellmembran von GKEZ führt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß klinisch-therapeutische Ansätze zum Teil auf die Erhaltung der Integrität der BHS gerichtet sind. Die an in vitro-Modellen der BHS erhaltenen Ergebnisse während Hypoxie/Reoxygenierung korrelieren mit den in vivo-Daten gut. Dies läßt weitere Untersuchungen in Zellkultur-Modellen der BHS sinnvoll erscheinen.

#### 1.4 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, (1) das antioxidative Potential von GKEZ und AZ zu vergleichen und (2) mögliche Einflüsse von AZ auf das antioxidative Potential von GKEZ zu untersuchen. Dies erschien aus verschiedenen Gründen sinnvoll. Das hohe antioxidative Potential von mikrovaskulären Gefäßen des Gehirns scheint für die Aufrechterhaltung der BHS-Funktion von eminenter Bedeutung zu sein. Außerdem muß die BHS die Aufgaben einer antioxidativen Barriere zwischen Blut- (Radikalgenerierung) und Gehirnkompartment (geringe Menge an Antioxidantien) erfüllen. Trotzdem wurde das antioxidative Potential von GKEZ und AZ bisher nicht systematisch verglichen. Weiterhin ist bekannt, daß AZ verschiedene Eigenschaften der BHS in GKEZ unterstützen bzw. induzieren. Aus diesen Gründen wurde von der Annahme ausgegangen, daß AZ das antioxidative Potential der BHS zu erhöhen vermögen. Zur experimentellen Untersuchung dieser Fragestellung mußte ein in vitro-System gewählt werden, da nur mit diesem methodischen Ansatz Effekte der Kokultivierung von GKEZ und AZ beobachtet werden konnten.

Neben der Wechselwirkung zwischen GKEZ und AZ wurde das Verhalten des antioxidativen Potentials während Hypoxie/Reoxygenierung (als Modell einer zerebralen Ischämie/Reperfusion) untersucht, bei dem ROS zu einer Öffnung der BHS führen. Auch hier war ein Vergleich von GKEZ in Monokultur mit GKEZ in Kokultur mit AZ notwendig, weil AZ die Dichtheit von GKEZ-Monolayern während Hypoxie/Reoxygenierung aufrechterhalten können (Kondo et al., 1996a) und dies möglicherweise durch ein höheres antioxidatives Potential bedingt ist. Das antioxidative Potential der BHS wurde während einer kürzeren Hypoxie/Reoxygenierung ( $\leq 3$  h) untersucht, da hieraus therapeutische Ansätze zur Reduzierung von Hämorrhagien als Nebenwirkung der tPA-Therapie durch Stärkung der BHS resultieren könnten.

Um sowohl das antioxidative Potential der Zellen als auch die Radikalgenerierung zu erfassen, wurden die antioxidativen Enzyme CuZnSOD, MnSOD, Cat und GPx auf verschiedenen Ebenen (Aktivität, 2.3.1., Enzymprotein, 2.5.; mRNA, 2.4.1.), der Gehalt an Glutathion (2.3.2.) sowie die Membran-Lipidperoxidation (2.3.3.) bestimmt. Untersuchungen zur Signaltransduktion in Kokultur sowie bei Hypoxie/Reoxygenierung schlossen Messungen der Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B (2.4.2.) sowie des Einflusses von Zytokinen auf die Aktivitäten antioxidativer Enzyme ein. Als Parameter für die

Funktion der BHS diene die Fluoreszein-Permeabilität (2.6.).

## 2 Material und Methoden

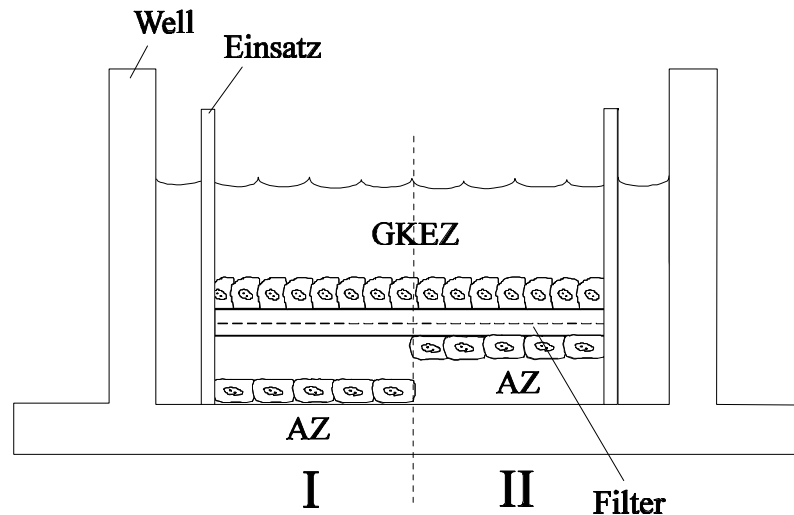
### 2.1 Präparation und Kultivierung der Zellen

RBE4-Zellen (rat brain capillary endothelial cells) entstammten einem immortalisierten Zell-Klon, der mit einem das E1A-Adenovirus-Gen enthaltenden Plasmid transfiziert worden war (zur Verfügung gestellt von Prof. Couraud, Paris, Frankreich; Roux et al., 1994). Die Kultivierung in der 43. bis 55. Passage erfolgte in HAM's F10/ $\alpha$ -Medium (1:1) mit 10% fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 10 ng/ml basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor, bFGF), 300  $\mu$ g/ml Geneticin (Boehringer Mannheim) und 2,5  $\mu$ g/ml Amphotericin B (Biochrom). Konfluente RBE4-Zellen boten eine polygonale Morphologie ('Pflasterstein-Muster').

Primäre GKEZ wurden aus Wistar-Ratten isoliert, die 3 Wochen alt waren und durch Dekapitation getötet wurden. Das Kulturmedium bestand aus Dulbecco's MEM mit 1,2 mM L-Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 2,5  $\mu$ g/ml Amphotericin B (Biochrom), 100  $\mu$ g/ml Heparin, 110  $\mu$ g/ml Na-Pyruvat (Sigma), 10  $\mu$ g/ml endotheliales Wachstumsfaktor (endothelial cell growth factor, ECGF; Boehringer Mannheim) und 20% fetalem Kälberserum. Konfluente primäre GKEZ besaßen lichtmikroskopisch eine spindelförmige Gestalt.

Primäre AZ wurden aus den Cortices neonataler Wistar-Ratten isoliert. Die Tötung der Tiere erfolgte mittels zervikaler Dislokation am 3. Tag post natum. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's MEM mit 2 mM L-Glutamin, 10% fetalem Kälberserum, 100 I.E./ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 2,5  $\mu$ g/ml Amphotericin B. Über 95% der Zellen besaßen den für AZ typischen Marker gliales fibrilläres saures Protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP). Vereinzelt waren Oligodendrozyten und Mikroglia-Zellen nachweisbar (Immunocytochemie siehe 2.5.). Die Mikroglia lag meist in einem aktivierten Zustand vor (amöboid, gerundet, auf der AZ-Schicht aufliegend).

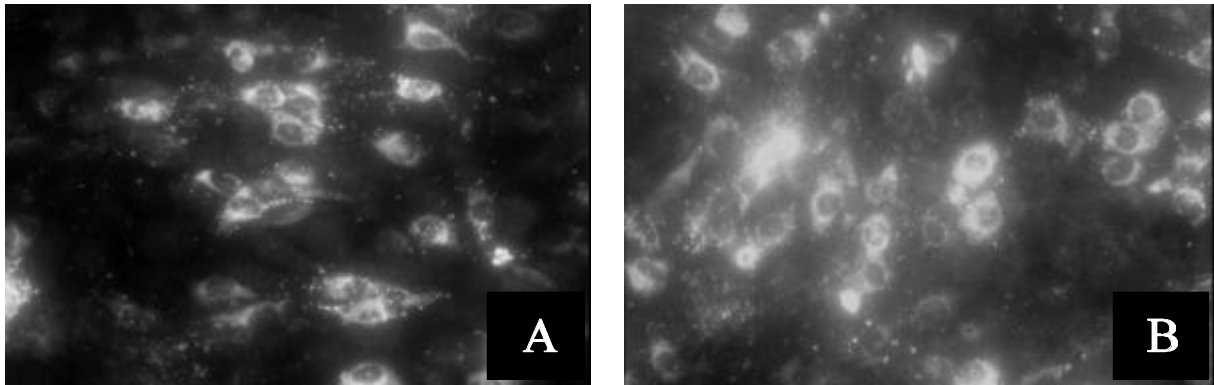
Monokulturen von RBE4 bzw. primären GKEZ wurden für biochemische Analysen in mit Rattenschwanz-Kollagen Typ I (Sigma) beschichteten 6-Well-Platten (Falcon) angelegt. Für immunocytochemische Untersuchungen und Bestimmungen des mRNA-Gehaltes wurden RBE4 auf mit Rattenschwanz-Kollagen Typ I beschichteten Filtern monokultiviert. Die Kokultivierung von RBE4 mit AZ wurde in zwei unterschiedlichen Modellen durchgeführt (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1** Kokultur-Modelle aus Gehirnkapillarendothelzellen (GKEZ) und Astrozyten (AZ) ohne (Modell I) bzw. mit morphologischem Kontakt (Modell II).

Im Kokultur-Modell I wurden RBE4 auf Filtereinsätzen kultiviert ( $0,45\ \mu\text{m}$  Porengröße,  $1,6 \times 10^6$  Poren/ $\text{cm}^2$ , Falcon, beschichtet mit Rattenschwanz-Kollagen Typ I). AZ wuchsen auf dem Boden der 6-Well-Platten, welche die Filter enthielten. Im Kokultur-Modell II wurden die AZ auf der gegenüberliegenden Seite des Filters kultiviert. Während im Modell II morphologische Kontakte zwischen RBE4 und AZ bestanden, war im Modell I nur eine humorale Interaktion zwischen beiden Zelltypen möglich. In der Kokultivierung wurde dem Medium für die RBE4 kein bFGF zugesetzt; Geneticin wurde gegen 100 I.E./ml Penicillin sowie 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin ausgetauscht. Damit sollten artifizielle Einflüsse auf die AZ ausgeschlossen werden. bFGF erhöht in Endothelzellen das antioxidative Potential (Yang und de Bono, 1997). Dies könnte auch für AZ zutreffen. Geneticin wirkt konzentrationsabhängig auf Zellen ohne Resistenzgen, wie z. B. AZ, toxisch.

Beide Typen von GKEZ besaßen allgemeine Endothelzell-Marker wie Faktor VIII, Angiotensin-konvertierendes Enzym sowie GKEZ-Marker wie alkalische Phosphatase und  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase. RBE4 exprimierten außerdem die GKEZ-Marker Transferrin-Rezeptor und das zonula-occludens-Protein ZO-1, welche primäre GKEZ bekanntermaßen besitzen. Faktor VIII, alkalische Phosphatase und  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase wurden in der Kokultur stärker als in der Monokultur exprimiert (Immunocytochemie siehe 2.5.). Abbildung 2.2 zeigt die verstärkte Expression von Faktor VIII in RBE4 in Kokultur mit AZ im Vergleich mit der Monokultur.

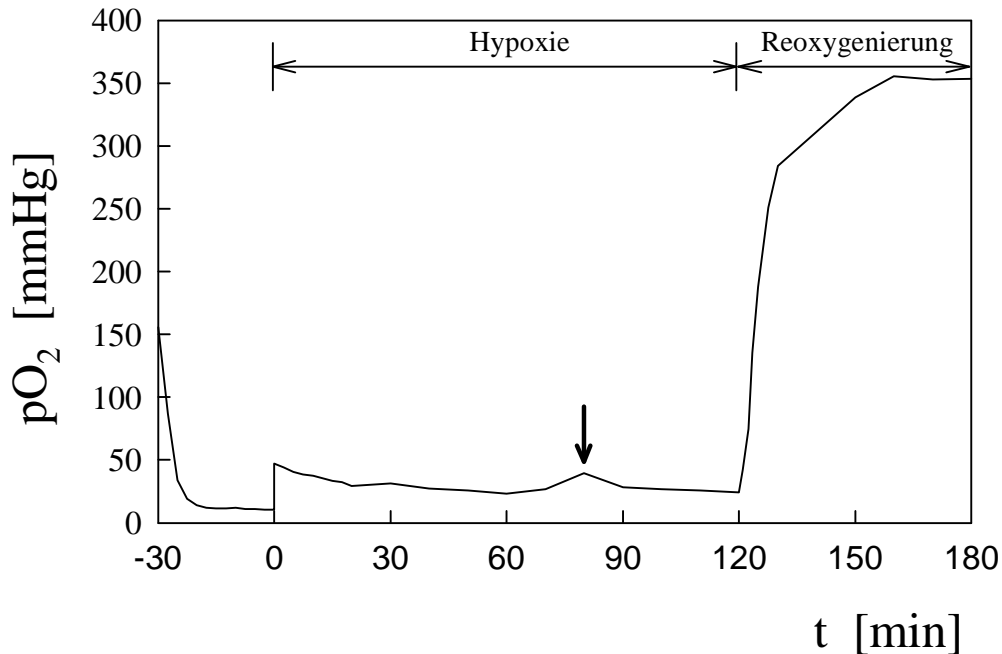


**Abb. 2.2** Faktor VIII-Immunoreaktivität in RBE4 in (A) Monokultur und (B) Kokultur mit AZ (Kokultur ohne morphologischen Kontakt). Cy3; Vergrößerung 400 x.

RBE4 besitzen folglich typische Eigenschaften von GKEZ und sind als Modell für Untersuchungen von GKEZ geeignet.

## 2.2 Hypoxie/Reoxygenierung

Vor der Hypoxie/Reoxygenierung wurden die konfluenten Monolayer von RBE4 bzw. AZ zweimal mit Phosphat-gepufferter Lösung (phosphate buffered saline; PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , Glukose-frei, pH 7,2; Biochrom) gewaschen. Anschließend wurde zu jedem Well 1 ml PBS gegeben, wobei die PBS zuvor mit Nelson-Gas (95%  $\text{N}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ) gesättigt worden war. Die Hypoxie von 2 h wurde durch weitere Begasung mit Nelson-Gas im Wasserbad bei 37 °C hergestellt (erzielter  $\text{pO}_2$  in der Inkubationslösung ca. 20 mmHg, 3%  $\text{O}_2$ ). In der nachfolgenden Reoxygenierung wurden die Zellkulturen mit Carbogen (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ) über 0,5 oder 1 h begast. Im Inkubator platzierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Begasung erfolgte in 6-Well-Platten, bei denen jedes Well separat über den Deckel begast wurde. Abbildung 2.3 zeigt den mit einem Oxymeter (Oxi 538/Cellox 325; WTW Weilheim) gemessenen  $\text{pO}_2$  während 2 h Hypoxie gefolgt von 1 h Reoxygenierung in der begasten PBS. Zur Messung der Fluoreszein-Permeabilität wurde die Hypoxie auf 1 h verkürzt.



**Abb. 2.3** Sauerstoff-Partialdruck ( $pO_2$ ) während 2 h Hypoxie gefolgt von 1 h Reoxygenierung. Messung erfolgte in begaster PBS. Vor Beginn der Begasung in 6-Well-Platten wurde die PBS für 30 min mit Nelson-Gas durchströmt (-30 bis 0 min). An der mit Pfeil markierten Stelle wurde der Begasungsdruck kurzzeitig verringert.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Aktivität antioxidativer Enzyme

Vor Messung der Enzymaktivitäten wurden die Zellen in aqua dest aufgenommen (200  $\mu$ l pro Well einer 6-Well-Platte) und mittels Frieren/Tauen (flüssiger  $N_2$ ) sowie nachfolgender Ultraschall-Behandlung (3 x 5 s, 0-2 °C) lysiert. Die Messungen erfolgten photometrisch (Beckman-Spektrophotometer DU 640) indem Substratabbau (Cat) bzw. die Metabolisierung anderer Substanzen (gekoppelte Tests für CuZnSOD, MnSOD und GPx) zeitabhängig verfolgt wurden (Tab. 2.1). Die Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt, der mit einer modifizierten Lowry-Methode (Sigma) bestimmt wurde, bezogen.



**Tab. 2.1** Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität von CuZnSOD, MnSOD, Cat und GPx.

Enzym	Prinzip	Einheit	$\lambda$ (nm), Substanz	T (°C)	Hersteller, Referenz
<b>CuZnSOD (SOD1)</b>	Xanthin/Xanthin Oxidase generieren $\text{O}_2^-$ , das mit INT zu einem roten Formazan-Farbstoff reagiert. SOD konkurriert mit INT um $\text{O}_2^-$ . SOD-Aktivität=Grad der Hemmung der Reaktion von $\text{O}_2^-$ mit INT. Kalibrierung mit Standardkurve.	$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	505, INT	37	Randox (SD 125), Suttle (1986)
<b>MnSOD (SOD2)</b>	Assay wie CuZnSOD, Zugabe von 1 mM KCN zur spezifischen Hemmung von CuZnSOD.				
<b>Cat</b>	Abbau von $\text{H}_2\text{O}_2$ (Substrat der Cat) wurde verfolgt.	$\text{k in } \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	240, $\text{H}_2\text{O}_2$	30	Aebi (1987)
<b>GPx</b>	Die Reduktion von Cumen-Hydroperoxid durch GPx führt zur Oxidation von NADPH via GSH (gekoppeltes Assay mit Glutathion-Reduktase).  Messung der Gesamt-GPx-Aktivität.	$\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	340, NADP <sup>+</sup>	37	Randox (RS 506), Paglia und Valentine (1967)

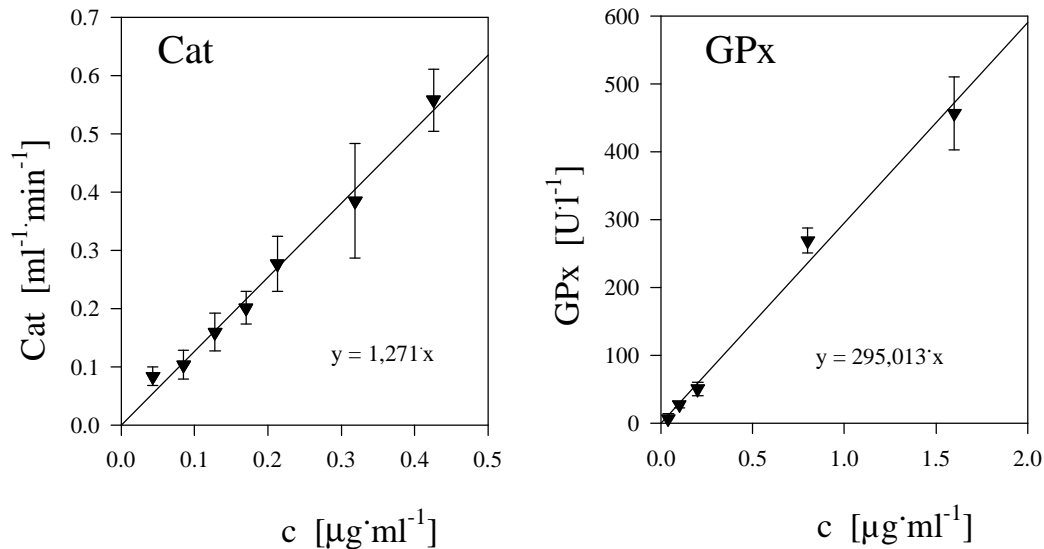
(INT = 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenol]-5-Phenyltetrazolium Chlorid; GSH = reduziertes Glutathion)

Zur Validierung der Methodik wurden für Cat sowie GPx Messungen mit gereinigtem Enzym (Sigma) durchgeführt. Die Standardkurven zeigten einen nahezu linearen Verlauf (Abb. 2.4). Vor jeder Messung der SOD-Aktivität in Proben wurde eine Standardkurve durch Vermessung gereinigten Enzyms angefertigt (Abb. 2.5). Die Aktivitätsbestimmung in den Proben erfolgte nach Möglichkeit im Bereich des stärksten Anstieges der sigmoiden Standardkurve.

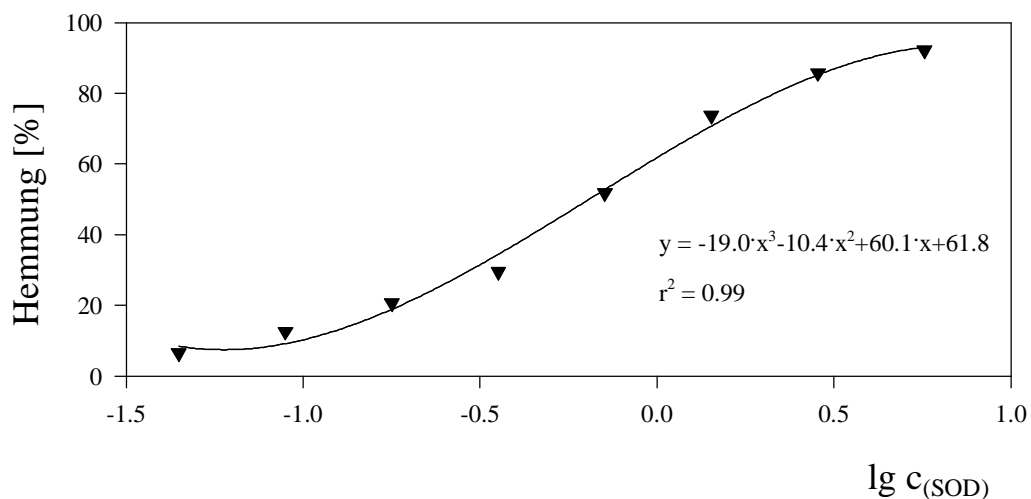
### 2.3.2 Glutathion-Gehalt

Der Glutathion-Gehalt wurde nach Griffith (1990) bestimmt. Die Zellen wurden in 5% Sulfosalicyl-Säure aufgenommen (200  $\mu\text{l}$  pro Well einer 6-Well-Platte). Anschließend wurde zentrifugiert (1000 g, 10 min; T62). Reduziertes Glutathion (GSH) reagierte mit Ellman's-Reagenz (5,5'-Dithio-bis[2-Nitrobenzoesäure], DTNB) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) und 2-Nitro-5-Thiobenzoesäure (TNB). Die Bildung von TNB wurde photometrisch verfolgt (412 nm, Raumtemperatur; Uvikon 931). Der Ansatz enthielt folgende Substanzen (Endkonzentration): Phosphatpuffer 100 mM (pH 7,5); Ethylendiaminteraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 5 mM; NADPH

0,2 mM; DTNB 0,6 mM; Gluta-



**Abb. 2.4** Abhängigkeit der im Assay gemessenen Aktivität von Cat bzw. GPx von der eingesetzten Konzentration gereinigten Enzyms (c). MW $\pm$ SD; n=5 (Cat), n=4 (GPx).



**Abb. 2.5** Standardkurve zur Messung der Aktivität von CuZn- und MnSOD. Die prozentuale Hemmung der Reaktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  mit INT durch SOD (als Maß für deren Aktivität) wurde gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Konzentration der Standard-SOD aufgetragen. MW von 6 Messungen je SOD-Konzentration.

thion-Reduktase 1 kU/l (für Bestimmung von GSSG 4 kU/l). GSH und GSSG wurden

separat bestimmt in Abwesenheit (Gesamt-Glutathion) oder nach Inkubation mit 8% 2-Vinylpyridin für 1 h (GSSG) unter Nutzung von Standards zur Kalibrierung. Der jeweilige Gehalt an Glutathion wurde auf den Proteingehalt (Bradford, 1976) bezogen und in  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  angegeben.

### **2.3.3 Lipidperoxidation**

Die Zellen wurden in aqua dest aufgenommen (400  $\mu\text{l}$  pro Well einer 6-Well-Platte). Die Zellsuspension wurde anschließend für 1 h in 1,5 ml Endvolumen (75 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 10 mM Thiobarbitur-Säure) gekocht. Die Reaktion wurde durch Kühlung auf Eis gestoppt. Unmittelbar vor der Hochperformanz-Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC; Wong et al., 1987) wurde 1,5 ml 100 mM NaOH in Methanol (90%) dazugegeben (Eluent: 50 mM K-Phosphat-Puffer, pH 6,8, 40% Methanol). Mit der HPLC wurde der Gehalt an Malondialdehyd bestimmt (Shimadzu LC-10A Chromatograph mit RF-10A Fluoreszenz-Detektor; Säule Supelcosil 150 x 4 mm LC-18-S). Dabei wurde an Thiobarbitur-Säure gebundenes Malondialdehyd bei 525 nm detektiert und mittels Standard-Eichkurven (Malondialdehydbis-[diethylacetal]; Merck) quantifiziert. Der Gehalt an Malondialdehyd wurde in  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  Protein (Lowry, Sigma) angegeben.

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 Gehalt an mRNA der Mangan-Superoxiddismutase**

Der Gehalt an MnSOD-mRNA wurde mittels reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) bestimmt. Die zelluläre Gesamt-RNA wurde mit TRIzol-Reagenz (Gibco-BRL; Chomczynski und Sacchi, 1987) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert (Aufnahme der Zellen von 3 Wells einer 6-Well-Platte in 1 ml TRIzol). Die Integrität der isolierten RNA wurde mit Agarose Gel-Elektrophorese kontrolliert. Nach der Bestimmung der Konzentration der totalen RNA bei 260 nm wurden 2  $\mu\text{g}$  der Gesamt-RNA für die reverse Transkription (RT) zur Herstellung von first-strand cDNA eingesetzt (200 U M-MLV Reverse Transkriptase [Gibco-BRL], 33 U RNAsin [Promega], jeweils per  $\mu\text{g}$  RNA; 5  $\mu\text{M}$  Random-Hexamere, 1 mM Desoxynucleosidtriphosphate [dNTPs], 10 mM Dithiothreitol [DTT]).

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden folgende Intron-überspannende Primer verwendet:  $\beta$ -Actin, 5'-TAC AAC CTC CTT GCA GCT CC-3' sowie 5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CTG TC-3' (Tib Molbiol); MnSOD, 5'-GAC



### 2.4.2 Bindungsaktivität des nukleären Faktors- $\kappa$ B

Die Bestimmung der Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B erfolgte nach Schreiber et al. (1989) sowie Suzuki und Packer (1993) mittels Gel-Elektromobilitätsshift-Assay (gel electrophoretic mobility shift assay, EMSA).

Zur Extraktion der nukleären Proteine wurden die Zellen (pro Probe zwei 75 cm<sup>2</sup> Flaschen konfluenter Kulturen; ca. 10<sup>7</sup> Zellen) in eiskalter PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Glukose) aufgenommen und zentrifugiert (Hermle Z 360 K; 7500 g, 5200 rpm, 30 s). Anschließend wurde die Zellmembran lysiert (700  $\mu$ l Puffer aus 0,3% Brij 97 [Sigma]; 50 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,4), gefolgt von erneuter Zentrifugation (Hermle Z 360 K; 7500 g, 5200 rpm, 30 s). Die im Sediment enthaltenen Zellkerne wurden mit 50  $\mu$ l 20 mM Hepes pH 7,9; 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM Ethylen-Glycol-bis[ $\beta$ -Aminoethylether]N,N,N',N'-Tetraessigsäure; 1 mM DTT; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid lysiert. Nach Zentrifugation (Biofuge 13; 13800 g, 13000 rpm, 5 min) wurde der Überstand, der die extrahierten nukleären Proteine enthielt, entnommen und bei -80 °C gelagert.

Vor Durchführung des EMSA wurde der Protein-Gehalt bestimmt (Bradford, 1976). NF- $\kappa$ B-bindende Oligonukleotide wurden mit [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP (Amersham) durch eine T4-Polynukleotidkinase (Pharmacia) radioaktiv markiert und mit Hilfe einer Säule (G-50 Sephadex, Pharmacia) vom verbliebenen [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP gereinigt. 5  $\mu$ g des Extraktes nukleärer Proteine wurden über 30 min mit [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-markierten, 1  $\mu$ l NF- $\kappa$ B-bindenden Doppelstrang-Oligonukleotiden (65.000 counts/ $\mu$ l) und 3  $\mu$ g poly(dI/dC) (Pharmacia) inkubiert, um die Bindung von NF- $\kappa$ B an die markierten Oligonukleotide zu ermöglichen. Die DNA-Protein-Komplexe wurden mit Mobilitätsshift elektrophoretisch (Sigma PS 500-2; 100-200 V; ca. 15 mA) in einem 4% igen Polyacrylamid-Gel mit 12,5 mM Trisborat, 0,25 mM EDTA (pH 8,0) aufgetrennt. Anschließend erfolgte Autoradiographie und densitometrische Auswertung der Autoradiogramme (EASY-Win 32). Zur Kontrolle der Spezifität wurden einzelne Proben mit AP-1- bzw. NF- $\kappa$ B-bindenden Oligonukleotiden, die nicht radioaktiv markiert waren, vor der Gel-Elektrophorese inkubiert.

## 2.5 Immunozytochemische Methoden

### 2.5.1 Verwendete Antikörper

Die in den Experimenten eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Für Doppelimmunofluoreszenz wurden jeweils ein Zelltyp-spezifischer Marker (z. B. GFAP für Astroglia) und ein zusätzliches Antigen (z. B. MnSOD) kombiniert.

**Tab. 2.2** Antikörper, die bei den immunozytochemischen Untersuchungen verwendet wurden.

Antigen	Zelltyp	Hersteller
<b>GFAP</b> (gliales fibrilläres saures Protein, glial fibrillary acidic protein)	Astroglia	DAKO
<b>O4</b>	Oligodendroglia	
<b>ILB-4</b> (Lectin von <i>Bandeiraea Simplicifolia</i> BS-I Isolectin B4, markiert mit FITC)	Mikroglia	Sigma
<b>Factor VIII</b> (von-Willebrand-Faktor)	Endothel	DAKO
<b>OX26</b> (Transferrin-Rezeptor)	GKEZ	Dianova
<b>ZO-1</b> (zonula-occludens-Protein)		Chemicon
<b>MnSOD</b>		Asayama und Burr, 1985
<b>Maus-Immunglobulin</b> (markiert mit Cy2, Cy3, DTAF)		Dianova
<b>Kaninchen-Immunglobulin</b> (markiert mit Cy3)		Dianova
<b>Ratten-Immunglobulin</b> (markiert mit Rhodamin)		Chemicon

(Cy2 = Carbocyanin; Cy3 = Indocarbocyanin; DTAF = Dichlorotriazinyl-Fluorescein; FITC = Fluorescein-Isothiocyanat)

### 2.5.2 Färbeprotokoll

Nach dreimaligem Spülen (PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , Glukose) wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert (15 min), erneut gewaschen, mit 10% Ziegenserum inkubiert (10 min) und in 0,5% Triton-X 100 lysiert. Anschließend wurden die Proben mit dem primären Antikörper sowie nach nochmaligem Waschen mit dem sekundären

Antikörper inkubiert (je 1 h, 37 °C). Nach Waschen und Trocknen wurden die Proben in Immu-Mount (Shandon) auf Objektträgern fixiert. Als Kontrolle dienten Proben ohne primären Antikörper.

### **2.5.3 Fluoreszenz- und konfokale Laser-Scan-Mikroskopie**

Zur Auswertung der Immunofluoreszenz wurden ein Fluoreszenz-Mikroskop (BH2-RFCA; Olympus) und ein konfokales Laser-Scan-Mikroskop (LSM 410 invert; Zeiss-Jena GmbH, Germany) eingesetzt. Angeregt wurde mit einem Argon-Krypton-Laser (Emission 488 nm; Cy2) bzw. mit einem Helium-Neon-Laser (Emission 543 nm; Cy3). Detektiert wurde mit Bandpaß 515-565 nm (Cy2) bzw. Langpaß 570 nm (Cy3).

## 2.6 Permeationsmessung

Die Bestimmung der Permeabilität von GKEZ-Monolayern, die bis zur Messung mit AZ kokultiviert worden waren (Kokultur-Modell 1), erfolgte durch Zugabe von 2 ml 50  $\mu$ M Na-Fluoreszein (Molecular Probes) auf die Oberseite des Filters. Nach 10 min Inkubation wurde die Fluoreszein-Konzentration sowohl ober- als auch unterhalb des Filters fluorimetrisch gemessen (Exzitation 488 nm; Emission 512 nm; Perkin Elmer). Der Fluoreszein-Permeationskoeffizient wurde gemäß Dehouck et al. (1995) berechnet. Alle Daten wurden auf den Permeationskoeffizienten der Kontrolle vor Beginn der Hypoxie/Reoxygenierung (=100%) bezogen. Die Messungen wurden von D. Utepbergenov durchgeführt.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ SD) angegeben. Da a priori nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurde der Signifikanzgrad mit Hilfe des Mann-Whitney Rangsummentests (bei Vergleich zweier Gruppen) bzw. des Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks (bei Vergleich mehrerer Gruppen) ermittelt. An den Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks (der eine Aussage darüber trifft, ob sich mehrere Gruppen überhaupt signifikant voneinander unterscheiden) wurde ein Student-Newman-Keuls Test angeschlossen, um Aussagen über das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen zu erhalten. Im Falle der Experimente zur Untersuchung des antioxidativen Potentials während Hypoxie/Reoxygenierung wurden sämtliche Werte in Prozent der normoxischen Kontrolle (=100%) ausgedrückt. Regressionsanalysen (curve fitting) wurden mit dem Programm Sigma Plot, Scientific Graph System, Version 1.02 (Jandel Scientific) durchgeführt.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich von primären und immortalisierten Gehirnkapillarendothelzellen

Da der Zellklon RBE4 für die Experimente benutzt wurde, wurden seine Eigenschaften mit denjenigen von primären GKEZ unter Kontrollbedingungen verglichen. RBE4 besaßen ein primären GKEZ ähnliches Muster antioxidativer Schutzsysteme (Tab. 3.1). Die Aktivitäten von Cat, GPx, sowie der Gehalt an GSH und GSSG unterschieden sich nicht signifikant, im Gegensatz zur Aktivität von CuZnSOD und MnSOD. In RBE4 betrug die Aktivität von CuZnSOD  $184 \pm 13\%$ , von MnSOD  $23 \pm 7\%$  der Aktivität in primären GKEZ ( $=100\%$ ;  $p < 0,001$  für CuZnSOD;  $p < 0,05$  für MnSOD). Eine ausreichende Gesamt-SOD-Aktivität ist in RBE4 vorhanden. RBE4 sind folglich für Untersuchungen der antioxidativen Systeme bzw. des Radikalmetabolismus von GKEZ geeignet und wurden für alle weiteren Experimente verwendet.

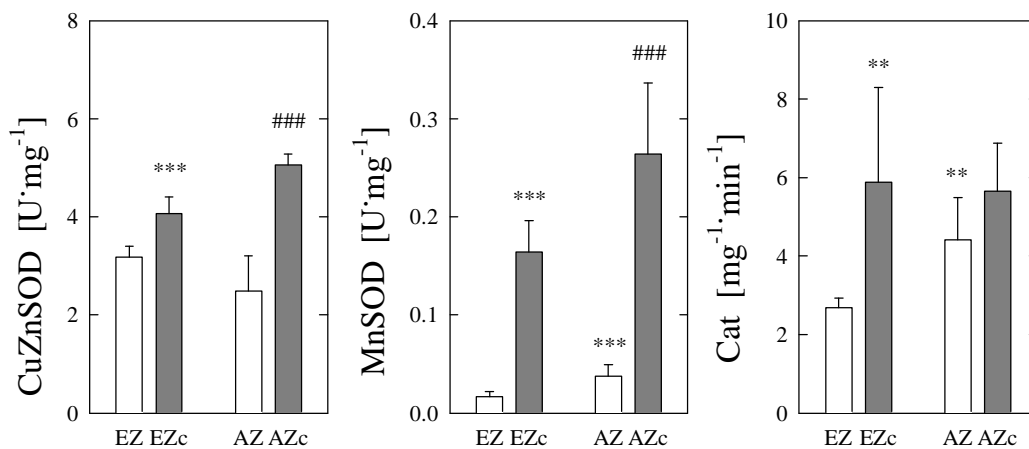
Die Unterschiede in der Aktivität von CuZnSOD und MnSOD könnten auf die Einflüsse anderer Zelltypen, z.B. AZ, auf primäre GKEZ im Gehirn vor der Zellisolierung zurückgeführt werden. Da MnSOD spezifisch durch TNF- $\alpha$  und IL-1 induziert wird (Wong und Goeddel, 1988), könnte die reduzierte MnSOD-Aktivität in RBE4 durch das Fehlen dieser Faktoren in vitro verursacht sein. CuZnSOD wird möglicherweise zur Kompensation der erniedrigten MnSOD-Aktivität in RBE4 induziert, um eine ausreichende Gesamtaktivität der SOD zu erreichen. Hierbei sind freie Radikale bzw. Oxidantien mögliche Mediatoren (Kong und Fanburg, 1992).

**Tab. 3. 1** Aktivität von CuZnSOD, MnSOD, Cat, GPx sowie Gehalt an GSH bzw. GSSG im Vergleich zwischen RBE4 und primären GKEZ. MW $\pm$ SD. Anzahl der Proben in Klammern. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich zu primären GKEZ (Mann-Whitney Rangsummentest).

	Aktivität von				Gehalt an	
	CuZnSOD (U · mg <sup>-1</sup> )	MnSOD (U · mg <sup>-1</sup> )	Cat (min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> )	GPx (U · g <sup>-1</sup> )	GSH (nmol · mg <sup>-1</sup> )	GSSG (nmol · mg <sup>-1</sup> )
<b>RBE4</b>	$3,19 \pm 0,22^{***}$ (10)	$0,016 \pm 0,005$ * (10)	$2,69 \pm 0,25$ (6)	$27,17 \pm 8,54$ (10)	$76,61 \pm 10,43$ (10)	$0,35 \pm 0,17$ (6)
<b>primäre GKEZ</b>	$1,73 \pm 0,58$ (6)	$0,07 \pm 0,04$ (3)	$2,61 \pm 0,77$ (5)	$28,22 \pm 16,4$ (7)	$89,45 \pm 21,1$ (8)	$1,91 \pm 2,62$ (6)

### 3.2 Antioxidative Enzyme und Substanzen in Monokultur

In Monokultur zeigten AZ ein höheres antioxidatives Potential als GKEZ (Abb. 3.1, 3.2 und 3.5). Die Aktivitäten von MnSOD, Cat und GPx erreichten in AZ  $229 \pm 68\%$ ,  $164 \pm 40\%$  bzw.  $449 \pm 89\%$  der Aktivität in GKEZ ( $=100\%$ ), wobei alle Differenzen signifikant waren ( $p < 0,003$ ). Die Aktivität von CuZnSOD sowie der Gehalt an GSH unterschieden sich in AZ und GKEZ nicht signifikant. GSSG war nur in GKEZ in geringen Mengen ( $0,35 \pm 0,17 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) nachweisbar.



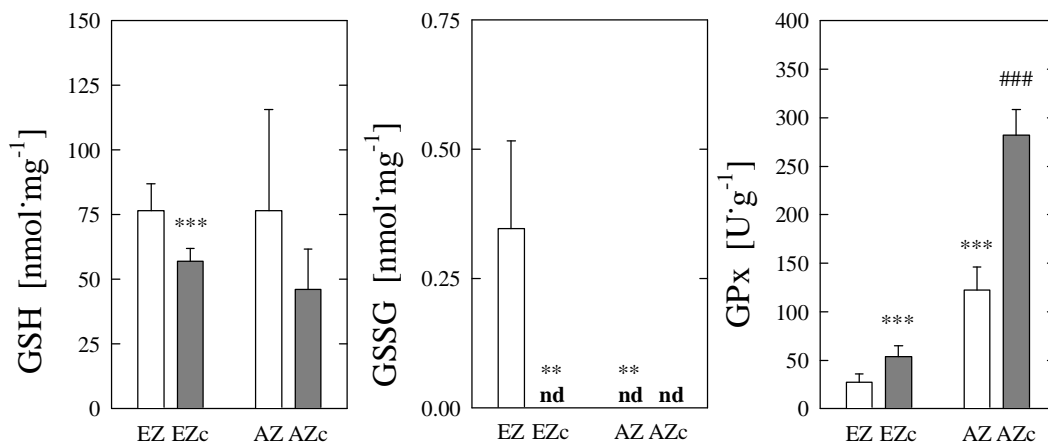
**Abb. 3.1** Aktivität von CuZnSOD, MnSOD und Cat in GKEZ (EZ) und AZ in Monokultur (leere Balken) und Kokultur ohne morphologischen Kontakt (EZc, AZc; schraffierte Balken). MW $\pm$ SD. CuZnSOD/MnSOD n=10; Cat n=6. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 im Vergleich zu EZ; ### p<0,001 im Vergleich zu AZ (Mann-Whitney Rangsummentest).

Um den spezifischen Gehalt von GKEZ sowie der verschiedenen Glia-Zelltypen an MnSOD-Enzymprotein zu bestimmen, wurden Kulturen aus GKEZ bzw. primären AZ immunozytochemisch untersucht (Kokalisation von MnSOD mit jeweiligen Zellmarkern ILB4, Mikroglia; GFAP, Astroglia; O4, Oligodendroglia; Daten nicht gezeigt). Die MnSOD-Immunoreaktivität war am stärksten in Mikroglia, gefolgt von Astroglia, ausgeprägt. In Oligodendrozyten wurde nur eine geringe Signalintensität beobachtet. Im Zytoplasma der AZ waren gleichmäßig verteilte, ca. 1,6  $\mu\text{m}$  große elliptiforme Strukturen sichtbar, die in Lokalisation und Größe höchstwahrscheinlich MnSOD-positive Mitochondrien darstellten (Abb. 3.4; 1C). In monokultivierten GKEZ wurde ein schwaches Signal erhalten; Mitochondrien waren nicht deutlich darstellbar

(Abb. 3.4; 1A und 1B). Die Signalintensität unterschied sich in monokultivierten GKEZ bzw. AZ nicht wesentlich (Abb. 3.4; 1B und 1C). Der Gehalt an MnSOD-mRNA, der mit RT-PCR bestimmt wurde, war in monokultivierten AZ hoch. In monokultivierten GKEZ konnte MnSOD-mRNA dagegen nicht bzw. nur in geringer Menge nachgewiesen werden (Abb. 3.5).

### 3.3 Antioxidative Enzyme und Substanzen in Kokultur

Wenn GKEZ und AZ kokultiviert wurden (Kokultur ohne morphologischen Kontakt), kam es zu einer signifikanten Aktivitätserhöhung der antioxidativ wirkenden Enzyme, verglichen mit den entsprechenden Monokulturen (Abb. 3.1 und 3.2). Eine Ausnahme bildete Cat in AZ, die in ihrer Aktivität nicht signifikant verändert war (nur leichte Erhöhung in kokultivierten AZ auf  $128 \pm 28\%$  der Aktivität in monokultivierten AZ). In AZ waren die Aktivitäten von CuZnSOD und GPx auf  $203 \pm 9\%$  und  $231 \pm 22\%$ , in GKEZ die Aktivitäten von CuZnSOD, Cat und GPx auf  $128 \pm 10\%$ ,  $219 \pm 90\%$  bzw.  $199 \pm 40\%$  im Vergleich zur entsprechenden Monokultur gestiegen. Für MnSOD wurden die größten Aktivitätserhöhungen gefunden: In AZ ein Anstieg auf  $698 \pm 193\%$ , in GKEZ auf  $993 \pm 196\%$  der Aktivität der Monokultur.

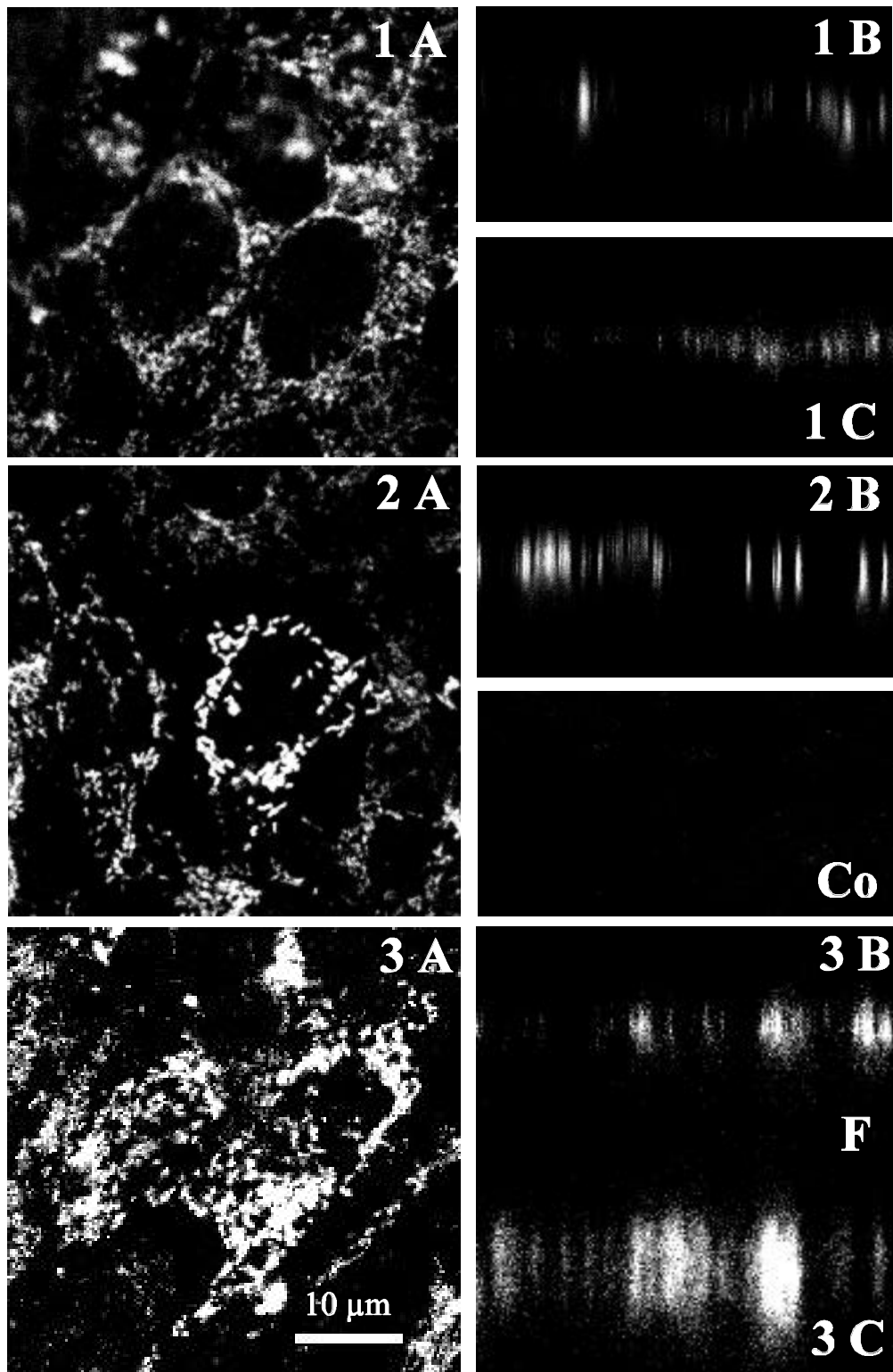


**Abb. 3.2** Gehalt an GSH und GSSG sowie Aktivität von GPx in GKEZ (EZ) und AZ in Monokultur (leere Balken) und Kokultur ohne morphologischen Kontakt (EZc, AZc; schraffierte Balken). MW $\pm$ SD. GSH/GPx n=10; GSSG n=6. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 im Vergleich zu EZ; ### p<0,001 im Vergleich zu AZ (Mann-Whitney Rangsummentest). 'nd' bedeutet 'nicht detektierbar'.

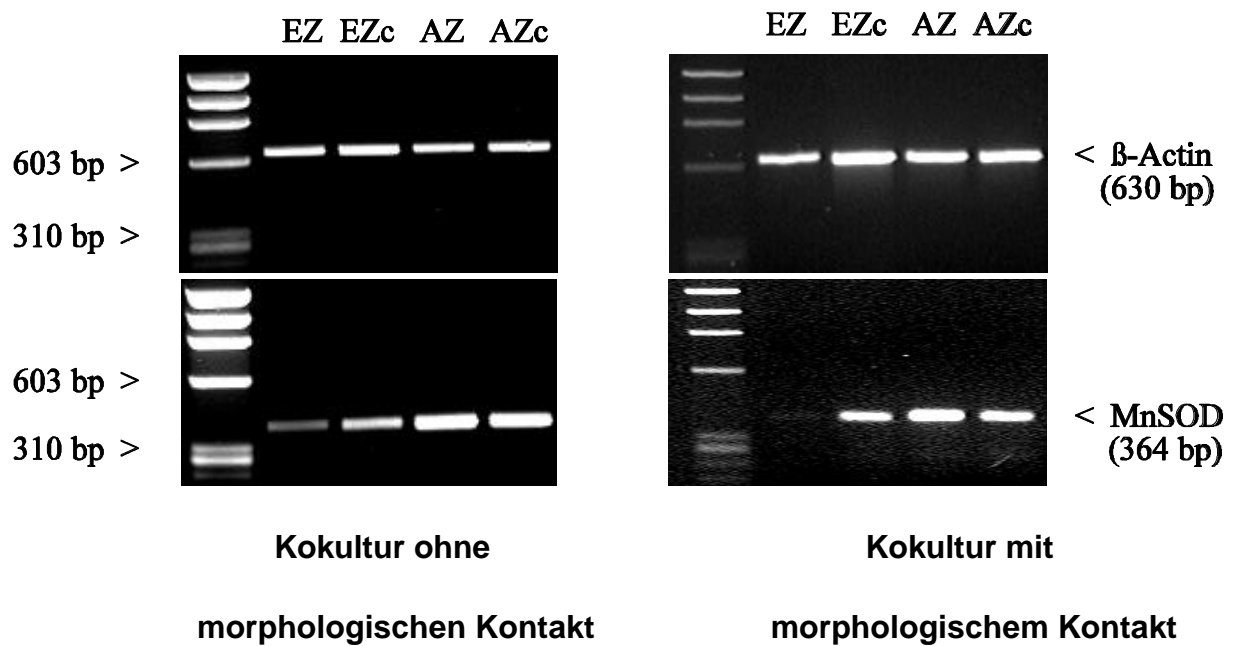
Sowohl in GKEZ als auch in AZ kam es zu einem Abfall des GSH-Gehaltes auf  $75\pm 6\%$  bzw.  $60\pm 20\%$  der entsprechenden Monokultur (Abb. 3.2), der jedoch nur in den GKEZ signifikant war ( $p < 0,001$ ). GSSG war unter Bedingungen der Kokultur weder in GKEZ noch in AZ nachweisbar.

Die Kokultivierung führte zu einer Zunahme der MnSOD-Immunoreaktivität sowohl in GKEZ als auch in AZ (Abb. 3.4). Hierbei konnte neben der Kokultur mit ausschließlich humoralem Kontakt (2A und 2B) auch jene Kokultur untersucht werden, bei der GKEZ und AZ in direktem morphologischen Kontakt standen (3A bis C). Die Immunoreaktivität nahm in GKEZ deutlich unter Kokultivierung zu, wobei die Kokultur mit morphologischem Kontakt die stärkste Signalintensität zeigte (3A und 3B). In der Kokultur mit ausschließlich humoralem Kontakt variierte die Immunoreaktivität zwischen den einzelnen GKEZ; in ca. jeder zehnten Zelle waren zahlreiche mitochondrienartige Strukturen sichtbar (2A und 2B). Auch in AZ kam es zu einer Zunahme der MnSOD-Immunoreaktivität durch Kokultivierung (1C und 3C). Unspezifische Hintergrundfärbung durch den sekundären, Cy3-markierten Antikörper war nicht vorhanden. Kolkalisationsuntersuchungen von MnSOD mit GFAP (Abb. 3.3; Anhang) zeigten, daß in der Kokultur mit morphologischem Kontakt ein Teil der MnSOD-Immunoreaktivität auf der Seite der GKEZ mit GFAP koinzidierte und, folglich, auf die die Filter permeierenden AZ-Endfüsse zurückzuführen sein könnte.

In beiden Kokultur-Modellen wurde auch der Gehalt von MnSOD-mRNA im Vergleich mit den entsprechenden Monokulturen mittels RT-PCR untersucht (Abb. 3.5). Kokultivierung mit AZ führte bei GKEZ zu einer deutlichen, für MnSOD-mRNA spezifischen Bande. In AZ kam es zu keiner wesentlichen Veränderung im Gehalt an MnSOD-mRNA durch Kokultivierung mit GKEZ.



**Abb. 3.4** MnSOD-Immunoreaktivität in GKEZ und AZ in Mono- und Kokultur (Markierung mit Cy3; konfokale Laser-Scan-Mikroskopie). GKEZ in **(A)** transversaler Ebene, **(B)** sagittaler Ebene. **(C)** AZ in sagittaler Ebene. **(1)** Monokultur von GKEZ bzw. AZ. **(2)** und **(3)** Kokultur von GKEZ mit AZ; in **(2)** ohne, in **(3)** mit morphologischem Kontakt. **(F)** Filter zwischen GKEZ und AZ. **(Co)** Kontrolle.



**Abb. 3.5** Gehalt an MnSOD-mRNA in GKEZ (EZ) und AZ in Monokultur bzw. Kokultur (EZc, AZc). β-Actin als endogener, externer Standard. Repräsentatives Beispiel von jeweils 4 unabhängigen Experimenten.

### 3.3.1 Signaltransduktion in Kokultur - Zytokine und Wachstumsfaktoren

Die Erhöhung des antioxidativen Potentials in kokultivierten GKEZ und AZ könnte durch Zytokine und Wachstumsfaktoren als Mediatoren vermittelt sein. Deshalb wurden beide Zelltypen mit IL-1β/TNF-α (Tab. 3.2) sowie bFGF/ECGF (Tab. 3.3) über mehrere Tage inkubiert und die Aktivitäten von MnSOD, CuZnSOD und GPx bestimmt. IL-1β und TNF-α veränderten in AZ die Aktivität von GPx kaum. Dasselbe traf für die MnSOD-Aktivität nach Inkubation mit IL-1β zu. Die CuZnSOD-Aktivität wurde unter IL-1β und TNF-α etwas vermindert (auf 95% bzw. 80%). Eine starke Erhöhung der MnSOD-Aktivität auf 195% der Kontrolle wurde nach der Inkubation mit TNF-α gefunden.

**Tab. 3.2** Aktivitäten von MnSOD, CuZnSOD und GPx in Prozent der Kontrolle (=100%) nach Inkubation von AZ mit IL-1β/TNF-α (2 ng/ml bzw. 1,7 ng/ml). MW±SD.

Zelltyp	t	n	Enzym	Kontrolle	IL-1β	TNF-α
AZ	2 d	2	MnSOD	100%	113%	195%
			CuZnSOD	100%	95%	80%
			GPx	100%	97%	102%

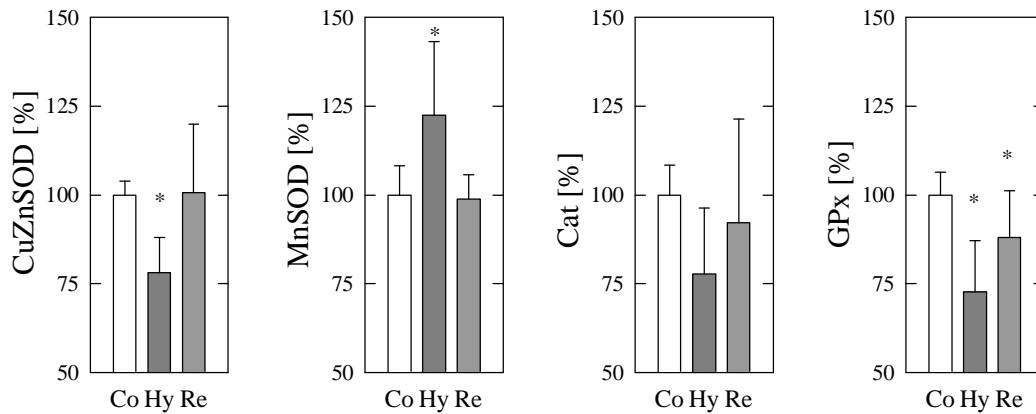
**Tab. 3.3** Aktivitäten von MnSOD, CuZnSOD und GPx in Prozent der Kontrolle (=100%) nach Inkubation von GKEZ und AZ mit bFGF/ECGF (10 ng/ml bzw. 20 µg/ml). MW±SD. \*p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle; One Way ANOVA gefolgt von Student-Newman-Keuls Test.

Zelltyp	t	n	Enzym	Kontrolle	bFGF	ECGF
GKEZ	3 d	4	MnSOD	100+14% (n=3)	112+8%	97+16%
			CuZnSOD	100±7%	76±9% *	80±3% *
AZ		2	MnSOD	100%	109%	120%
			CuZnSOD	100%	120%	104%
			GPx	100%	101%	87%

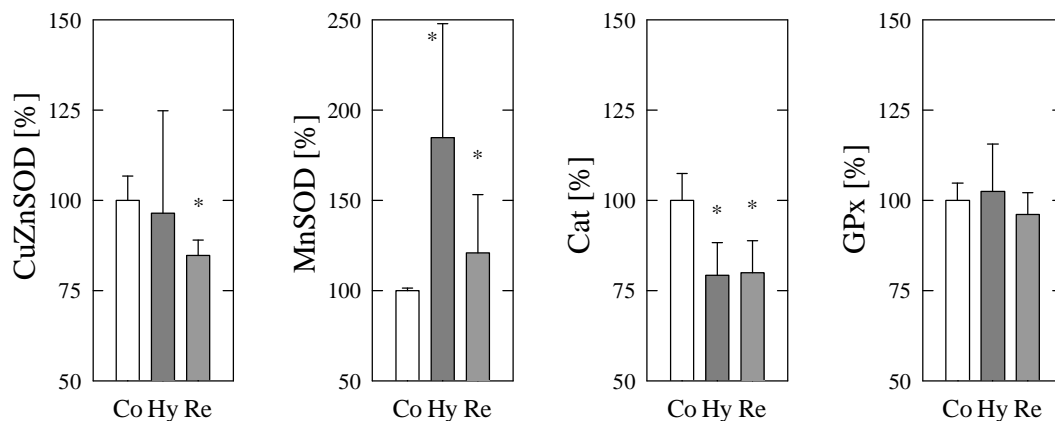
Wie aus Tabelle 3.3 zu entnehmen ist, beeinflussten bFGF und ECGF die Aktivität von GPx sowie CuZnSOD in AZ sowie diejenige von MnSOD in GKEZ kaum. Für MnSOD wurde eine leichte Erhöhung der Aktivität nach Inkubation mit ECGF in AZ gesehen. Die Aktivität von CuZnSOD fiel in GKEZ sowohl nach Inkubation mit bFGF als auch ECGF signifikant ab (auf 76±9 bzw. 80±3% der Kontrolle).

### 3.4 Antioxidatives Potential während Hypoxie/Reoxygenierung in Monokultur

Zur Einschätzung der antioxidativen Kapazität unter pathologischen Bedingungen wurden GKEZ und AZ nach einer zweistündigen Hypoxie mit Reoxygenierung von 0,5 h bzw. 1 h untersucht und mit normoxischen Inkubatorkontrollen verglichen. Dies erfolgte sowohl mit monokultivierten (Abb. 3.6 und 3.7) als auch mit kokultivierten Zellen (Abb. 3.11 und 3.12). In monokultivierten GKEZ (Abb. 3.6) kam es zu einem Abfall der Aktivitäten von CuZnSOD, Cat, und GPx nach der Hypoxie auf 78±10%, 78±19% bzw. 73±15% der normoxischen Kontrolle (p<0,05 für CuZnSOD und GPx), währenddessen die MnSOD-Aktivität auf 122±21% der Kontrolle anstieg (p<0,05). Nach 0,5 h Reoxygenierung waren die Aktivitäten von CuZnSOD und Cat wieder auf 101±19% bzw. 92±29% der normoxischen Inkubatorkontrolle angestiegen, von der sie sich nicht mehr signifikant unterschieden. Auch die Aktivität der GPx stieg wieder auf 88±13% der Kontrolle an, unterschied sich von der Kontrolle aber noch signifikant (p<0,05). Die MnSOD-Aktivität kehrte nach 0,5 h Reoxygenierung auf das Niveau der Kontrolle zurück (99±7% der Kontrolle). Nach 1 h Reoxygenierung (nicht gezeigt) hatte auch die GPx-Aktivität die Werte der Kontrolle wieder erreicht.



**Abb. 3.6** Aktivitäten von CuZnSOD, MnSOD, Cat und GPx nach 2 h Hypoxie (Hy) gefolgt von 0,5 h Reoxygenierung (Re) im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Co; =100%). GKEZ in Monokultur. MW $\pm$ SD. n=8. \*p<0,05 (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks gefolgt von Student-Newman-Keuls Test).



**Abb. 3.7** Aktivitäten von CuZnSOD, MnSOD, Cat und GPx nach 2 h Hypoxie (Hy) gefolgt von 0,5 h Reoxygenierung (Re) im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Co; =100%). AZ in Monokultur. MW $\pm$ SD. n=8 außer CuZnSOD, Hyp n=6, GPx, Hyp n=4. \*p<0,05 (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks mit Student-Newman-Keuls Test).

AZ zeigten sich in Monokultur resistenter gegenüber Hypoxie als GKEZ bezogen auf die Aktivitäten antioxidativer Enzyme (Abb. 3.7). Einzig die Cat-Aktivität war nach Hypoxie auf 79 $\pm$ 9% der normoxischen Kontrolle signifikant erniedrigt (p<0,05); CuZnSOD und GPx unterschieden sich in ihrer Aktivität im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant (96 $\pm$ 28% bzw. 102 $\pm$ 13% der Kontrolle). Die MnSOD-Aktivität hatte sich nach Hypoxie auf 185 $\pm$ 63% der Kontrolle erhöht (p<0,05). Während der folgenden 0,5 h

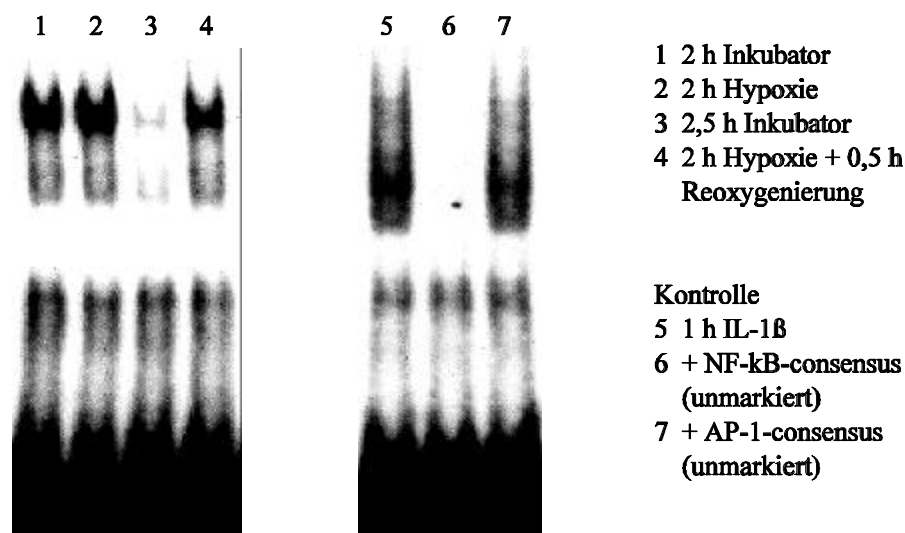


Reoxygenierung nahm die CuZnSOD-Aktivität auf  $85 \pm 4\%$  der Kontrolle ab ( $p < 0,05$ ); die MnSOD-Aktivität sank wieder auf  $121 \pm 33\%$  der Kontrolle, von der sie sich noch signifikant unterschied ( $p < 0,05$ ). Die Aktivitäten von Cat und GPx verblieben auf dem Niveau der Werte nach Hypoxie ( $80 \pm 8\%$  bzw.  $96 \pm 6\%$  der Kontrolle;  $p < 0,05$  für Cat).

### 3.4.1 Signaltransduktion während Hypoxie/Reoxygenierung

#### 3.4.1.1 Nukleärer Faktor- $\kappa$ B

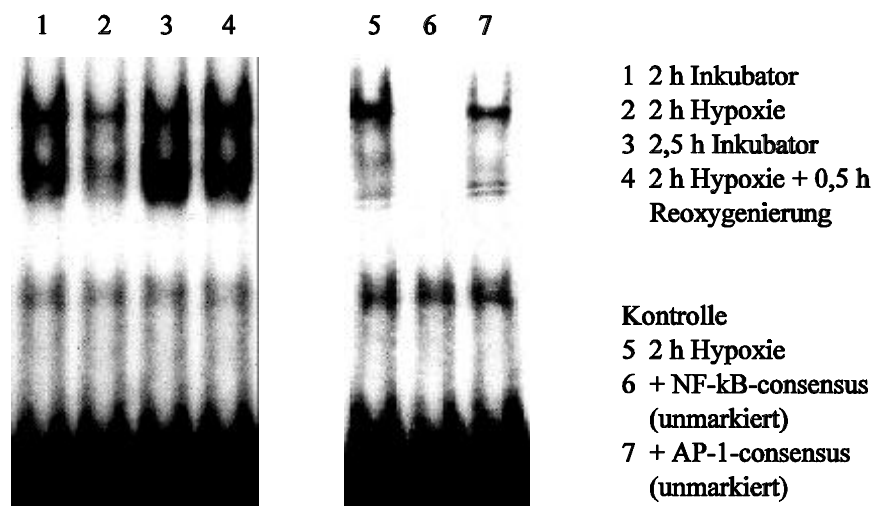
Da die Promoter-Bindungsregion für MnSOD vier potentielle Bindungsorte für NF- $\kappa$ B enthält (Ergebnis einer Genbankrecherche mit Programm der Genetics Computer Group, GCG, 1996; MnSOD-DNA-Sequenz nach Ho et al., 1991) und NF- $\kappa$ B in seiner Bindungsaktivität durch den Redoxzustand reguliert wird (Müller et al., 1997), wurde die Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B während Hypoxie/Reoxygenierung in GKEZ und AZ untersucht. Dies erbrachte für GKEZ und AZ unterschiedliche Ergebnisse.



**Abb. 3.8** Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in GKEZ nach 2 h Hypoxie gefolgt von 0,5 h Reoxygenierung. Inkubation mit IL-1 $\beta$  als Positivkontrolle.

In GKEZ (Abb. 3.8) unterschied sich die Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B zwischen hypoxischer Probe und normoxischer Kontrolle nicht (Bahn 2 und 1). Im Vergleich zwischen 0,5 h reoxygenierter Probe und entsprechender normoxischer Kontrolle nach

2,5 h Inkubator (Bahn 4 und 3) wurde die sehr schwache Bindungsaktivität in der Kontrolle deutlich. Vergleicht man die normoxischen Kontrollen (nach 2 bzw 2,5 h; Bahn 1 und 3) untereinander, nahm die Bindungsaktivität mit der Zeit ab. Die Bindungsaktivität der reoxygenierten im Vergleich zu der der hypoxischen Probe (Bahn 4 und 2) veränderte sich dagegen kaum. Als Positivkontrolle wurden GKEZ mit IL-1 $\beta$  (2 ng/ml), einem bekannten Aktivator von NF- $\kappa$ B, inkubiert (Bahn 5). Die Spezifität des dargestellten Signals für NF- $\kappa$ B wurde durch Zugabe von spezifisch NF- $\kappa$ B- bzw. AP-1-bindenden Oligonukleotiden, die nicht radioaktiv markiert waren, geprüft (Bahn 6 und 7).



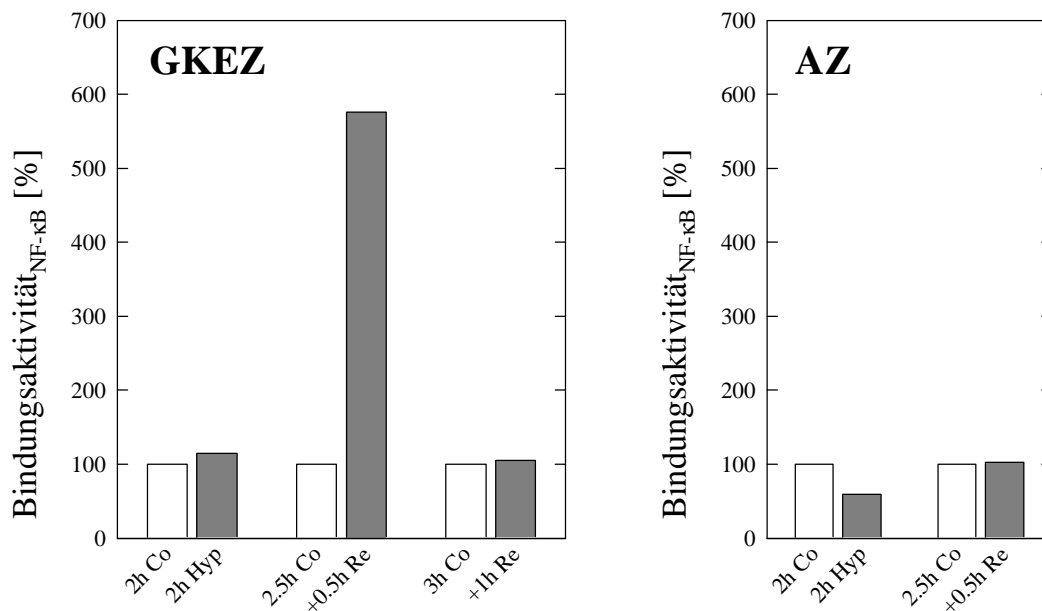
**Abb. 3.9** Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in AZ nach 2 h Hypoxie gefolgt von 0,5 h Reoxygenierung.

In AZ (Abb. 3.9) kam es in der hypoxischen Probe nach 2 h zu einer Abnahme der Bindungsaktivität im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Bahn 2 und 1). Nach 0,5 h Reoxygenierung hatte die Bindungsaktivität wieder das Niveau der normoxischen Kontrolle erreicht und leicht überschritten (Bahn 4 und 3). Die Kontrollen unter Zugabe von spezifisch NF- $\kappa$ B- bzw. AP-1-bindenden Oligonukleotiden, die nicht radioaktiv markiert waren, erwiesen die Spezifität des dargestellten Signals (Bahn 5 bis 7).

Die densitometrische Auswertung der in bezug auf die Bindungsaktivität von NF-

$\kappa$ B während Hypoxie/Reoxygenierung durchgeführten Experimente ist in Abbildung 3.10 dargestellt. GKEZ und AZ verhielten sich in Hypoxie bzw. Reoxygenierung unterschiedlich. In GKEZ kam es zu einem starken Anstieg der Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B nach 0,5 h Reoxygenierung auf 576% der entsprechenden normoxischen Kontrolle (=100%). Nach 2 h Hypoxie bzw. Hypoxie mit 1 h Reoxygenierung war keine auffällige Differenz zwischen Kontrolle und Probe beobachtbar. Bei AZ kam es zu einem Abfall der Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B nach 2 h Hypoxie auf 59% der entsprechenden normoxischen Kontrolle (=100%). Nach 2 h Hypoxie mit 0,5 h Reoxygenierung unterschieden sich Probe und Kontrolle nicht.

Zur Überprüfung der Frage, ob NF- $\kappa$ B die Erhöhung der MnSOD-Aktivität während der Hypoxie vermittelt, wurde Pyrrolidin-Dithiocarbamat, ein Inhibitor der Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Ferran et al., 1995), eingesetzt. Pyrrolidin-Dithiocarbamat hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Anstieg der Aktivität von MnSOD in der Hypoxie, weder in GKEZ noch AZ.



**Abb. 3.10** Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in monokultivierten GKEZ und AZ nach 2 h Hypoxie (Hyp) gefolgt von 0,5 bzw. 1 h Reoxygenierung (Re) im Vergleich zur entsprechenden normoxischen Kontrolle (=100%; Co). n=2; bis auf GKEZ 2 h Co n=4, 2 h Hyp n=3; AZ 2,5 h Co und +0,5 h Re n=1.

### 3.4.1.2 Zytokine

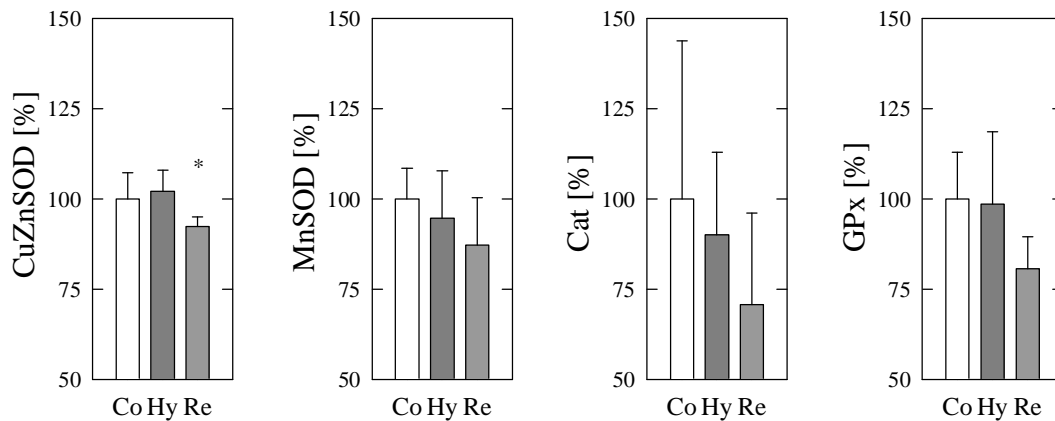
Da die MnSOD-Aktivität auf Grund autokriner Regulation durch die Zellen nach Hypoxie erhöht worden sein könnte, wurden GKEZ und AZ mit IL-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$ , bekannten Aktivatoren der MnSOD (Wong und Goeddel, 1988), über 2 bis 6 h inkubiert und die Aktivität der MnSOD gemessen. In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Bereits nach 2 h zeichnete sich eine Erhöhung der MnSOD-Aktivität in beiden Zelltypen ab, die jedoch in den GKEZ (auf 149 $\pm$ 31%) stärker als in den AZ (auf 124%; jeweils in bezug auf Kontrolle) ausgeprägt war. Der Anstieg der MnSOD-Aktivität hielt in den GKEZ nach 6 h an (auf 173 $\pm$ 52%), während sich in den AZ die MnSOD-Aktivität stabilisierte (auf 121%). Im Resultat sind die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in GKEZ und AZ in der Lage, die Aktivität von MnSOD innerhalb von 2 bis 6 h zu erhöhen.

**Tab. 3.4** MnSOD-Aktivität in GKEZ und AZ nach Inkubation mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  (2 ng/ml bzw. 1,7 ng/ml). Angabe in Prozent der Kontrolle (=100%). MW $\pm$ SD. \*p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle; Student-t-Test.

Zelltyp	t	n	Enzym	Kontrolle	IL-1 $\beta$ +TNF- $\alpha$
<b>GKEZ</b>	2 h	4	MnSOD	100 $\pm$ 28%	149 $\pm$ 31%
	6 h				173 $\pm$ 52% *
<b>AZ</b>	2 h	2	MnSOD	100%	124%
	6 h				121%

### 3.5 Antioxidatives Potential während Hypoxie/Reoxygenierung in Kokultur

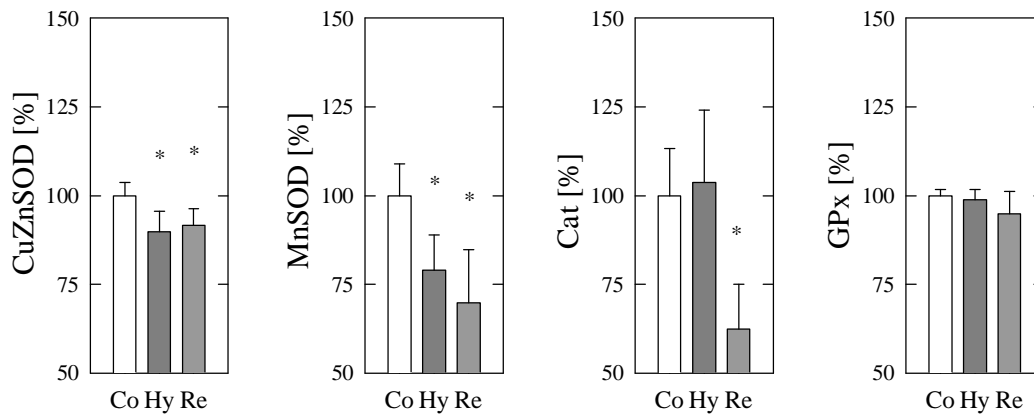
Die antioxidative Kapazität wurde neben Monokulturen ebenso in Kokulturen (ohne morphologischen Kontakt zwischen GKEZ und AZ) während Hypoxie/Reoxygenierung untersucht (Abb. 3.11 und 3.12). Hierbei zeigte sich, daß sich die Aktivitäten antioxidativ wirksamer Enzyme nach 2 h Hypoxie in Kokultur im Vergleich zu den jeweiligen Monokulturen weniger veränderten. Wie aus Abbildung 3.11 hervorgeht, kam es in kokultivierten GKEZ im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Monokultur zu keiner signifikanten Abnahme der Enzymaktivitäten nach 2 h Hypoxie. Die Aktivitäten von CuZnSOD, Cat und GPx betrugen 102 $\pm$ 6%, 90 $\pm$ 23% bzw. 99 $\pm$ 20% der Werte in der normoxischen Kontrolle. Der bei monokultivierten GKEZ gefundene Anstieg der MnSOD-Aktivität nach 2 h Hypoxie (Abb. 3.6) wurde



**Abb. 3.11** Aktivitäten von CuZnSOD, MnSOD, Cat und GPx nach 2 h Hypoxie (Hy) gefolgt von 0,5 h Reoxygenierung (Re) im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Co; =100%). GKEZ, in Kokultur mit AZ ohne morphologischen Kontakt. MW $\pm$ SD. n=8. \*p<0,05 (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks gefolgt von Student-Newman-Keuls Test).

in Kokultur nicht beobachtet; nach Hypoxie unterschied sich die MnSOD-Aktivität nicht signifikant von der normoxischen Kontrolle (95 $\pm$ 13% der Kontrolle). Nach 0,5 h Reoxygenierung waren die Enzymaktivitäten im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle erniedrigt (CuZnSOD auf 92 $\pm$ 3%, MnSOD auf 87 $\pm$ 13%, Cat auf 71 $\pm$ 25%, GPx auf 81 $\pm$ 9%), was jedoch nur im Falle der CuZnSOD signifikant war (p<0,05).

In kokultivierten AZ (Abb. 3.12) wurde nach 2 h Hypoxie ein Abfall der Aktivitäten von CuZnSOD und MnSOD auf 90 $\pm$ 6% bzw. 79 $\pm$ 10% der normoxischen Kontrollen beobachtet (p<0,05 in beiden Fällen). Die Aktivitäten von Cat und GPx veränderten sich in kokultivierten AZ nach Hypoxie nicht signifikant (104 $\pm$ 20% und 99 $\pm$ 3% im Vergleich zur Kontrolle). Der in monokultivierten hypoxischen AZ gefundene Anstieg der MnSOD-Aktivität (Abb. 3.7) war demnach, wie bereits in GKEZ beobachtet, in AZ in Kokultur nicht zu finden. Nach 0,5 h Reoxygenierung waren die Aktivitäten von CuZnSOD, MnSOD und Cat auf 92 $\pm$ 4%, 70 $\pm$ 15% bzw. 62 $\pm$ 13% der Kontrolle erniedrigt (p<0,05 für alle drei Enzyme). GPx unterschied sich in der Aktivität von der Kontrolle nicht signifikant (95 $\pm$ 6% der Kontrolle).

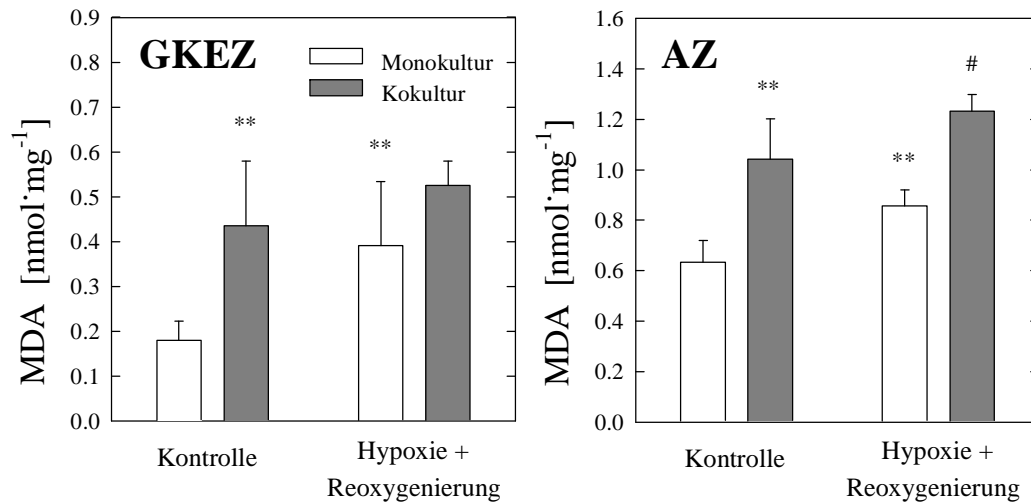


**Abb. 3.12** Aktivitäten von CuZnSOD, MnSOD, Cat und GPx nach 2 h Hypoxie (Hy) gefolgt von 0,5 h Reoxygenierung (Re) im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Co; =100%). AZ, in Kokultur mit GKEZ ohne morphologischen Kontakt. MW $\pm$ SD. n=8. \*p<0,05 (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks gefolgt von Student-Newman-Keuls Test).

### 3.6 Lipidperoxidation während Hypoxie/Reoxygenierung in Monokultur

Um ein Maß für die Generierung freier Radikale sowie die daraus folgenden Membranschäden zu erhalten, wurde die radikalinduzierte Lipidperoxidation während Hypoxie und Reoxygenierung als Gehalt an Malondialdehyd erfaßt. Diese ist im Vergleich zwischen GKEZ und AZ, sowohl in Mono- als auch in Kokultur mit ausschließlich humoralem Kontakt in Abbildung 3.13 dargestellt.

In monokultivierten AZ war der Malondialdehyd-Gehalt signifikant höher als in monokultivierten GKEZ (in AZ 354 $\pm$ 48% des Gehaltes von GKEZ; p=0,002 im Mann-Whitney Rangsummentest), jeweils unter Kontrollbedingungen. Nach 2 h Hypoxie mit 1 h Reoxygenierung stieg der Malondialdehyd-Gehalt in GKEZ auf 218 $\pm$ 82% der normoxischen Kontrolle an (p<0,01), währenddessen in AZ unter diesen Bedingungen nur ein leichter Anstieg auf 135 $\pm$ 10% der Kontrolle zu verzeichnen war (p<0,01). Die Werte nach alleiniger Hypoxie bzw. Hypoxie mit 0,5 h Reoxygenierung sind nicht dargestellt, da hier keine signifikante Erhöhung im Vergleich zur normoxischen Kontrolle vorhanden war. Folglich nahmen der Gehalt an Malondialdehyd und mithin die Lipidperoxidation im besonderen in der Reoxygenierungsperiode zwischen 0,5 und 1 h nach der Hypoxie zu.



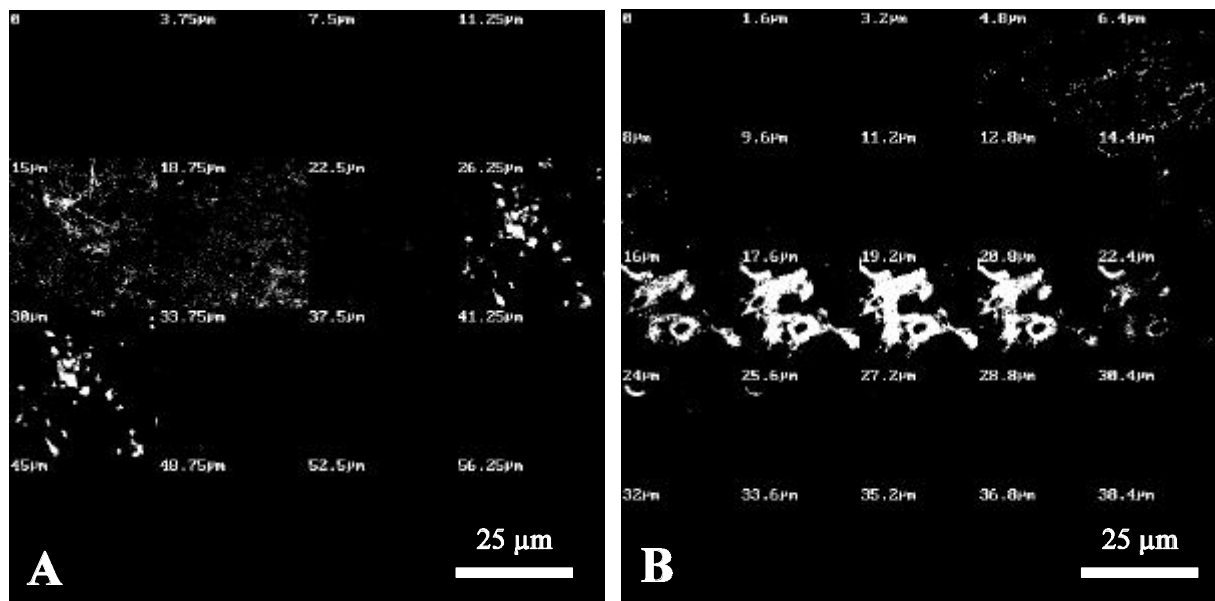
**Abb. 3.13** Gehalt an Malondialdehyd (MDA) in GKEZ und AZ nach 2 h Hypoxie gefolgt von 1 h Reoxygenierung im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Monokultur und Kokultur (ohne morphologischen Kontakt). MW±SD. n=6. \*\*p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle, Monokultur; # p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle, Kokultur (Mann-Whitney Rangsummentest).

### 3.7 Lipidperoxidation während Hypoxie/Reoxygenierung in Kokultur

In Kokultur war ein höherer Gehalt an Malondialdehyd sowohl in GKEZ als auch in AZ im Vergleich zur jeweiligen Monokultur beobachtbar: In GKEZ kam es zu einer Erhöhung auf  $243 \pm 81\%$  der Monokultur ( $p < 0,01$ ); in AZ war die Zunahme im Malondialdehyd-Gehalt geringer (auf  $165 \pm 25\%$  der Werte in Monokultur,  $p < 0,01$ ). Dabei unterschied sich der Malondialdehyd-Gehalt in kokultivierten GKEZ und AZ signifikant ( $p = 0,002$  im Mann-Whitney Rangsummentest) und betrug in AZ  $240 \pm 37\%$  der Menge in GKEZ ( $=100\%$ ). Hypoxie mit Reoxygenierung von 1 h führte in kokultivierten Zellen zu einem leichten Anstieg des Malondialdehyd-Gehaltes in GKEZ und AZ (auf  $121 \pm 13\%$  bzw.  $118 \pm 7\%$  der entsprechenden normoxischen Kontrolle;  $p < 0,05$  im Falle der AZ, nicht signifikant für GKEZ). Wie bereits in der Monokultur beobachtet, veränderten sich die Malondialdehyd-Werte nach isolierter Hypoxie bzw. Hypoxie mit 0,5 h Reoxygenierung nicht signifikant (Werte nicht gezeigt).

### 3.8 GFAP-Immunoreaktivität von Astrozyten in Mono- und Kokultur

Mit Hilfe indirekter Immunozytochemie wurde die Immunoreaktivität von GFAP (spezifischer Marker für AZ) in mono- bzw. kokultivierten AZ untersucht (Abb. 3.14). Hierbei sollte die Frage geklärt werden, ob Ausläufer der AZ die Filter bis zur Seite der GKEZ durchdringen können, wenn die AZ auf der unteren Seite des Filters kultiviert werden.



**Abb. 3.14** GFAP-Immunoreaktivität in AZ im Vergleich zwischen (A) Monokultur und (B) Kokultur mit GKEZ (AZ und GKEZ auf gegenüberliegenden Seiten des Filters). Markierung mit Cy2. Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie. Monokultur: 16 Aufnahmen alle 3,75 µm (56,25 µm erfaßt). Kokultur: 25 Aufnahmen alle 1,6 µm (38,4 µm erfaßt).

Bereits bei auf Filtern monokultivierten AZ (Abb. 3.14A) war GFAP-Immunoreaktivität nicht nur auf der Seite der ursprünglichen Aussaat (Schnitttiefe 15 µm) sondern ebenso auf der entgegengesetzten Seite des Filters nachweisbar (Schnitttiefe 26,25-30 µm). Folglich muß davon ausgegangen werden, daß Ausläufer der AZ durch die Filter (Porengröße 0,4 µm) hindurchgewachsen waren. In Kokultur (Abb. 3.14B) konnte dasselbe Phänomen beobachtet werden; sowohl auf der Seite der AZ (Schnitttiefe 16-22,4 µm) als auch auf derjenigen der GKEZ (Schnitttiefe 4,8-6,4 µm) war GFAP-Immunoreaktivität nachweisbar. In Kokultur besaßen die Somata der AZ eine stärkere Immunoreaktivität (Abb. 3.14B; Schnitttiefe 16-22,4 µm) als die Zellkörper von monokultivierten AZ (Abb. 3.14A; Schnitttiefe 15 µm). Daß die in den Filterporen



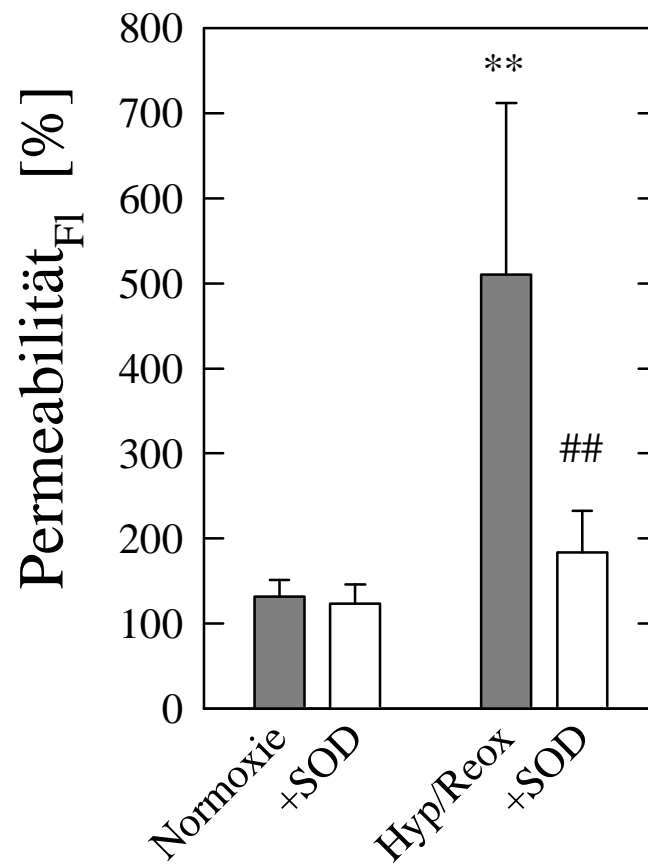
befindlichen AZ-Ausläufer keine GFAP-Immunoreaktivität zeigten, kann am ehesten auf die optischen Eigenschaften des konfokalen Laser-Scan-Mikroskopes zurückgeführt werden. Das Auflösungsvermögen des Laser-Scan-Mikroskopes ist aus optischen Gründen auf 200-400 nm beschränkt. Demnach läge der Porendurchmesser von 0,4 µm im Bereich der Nachweisgrenze.

### **3.9 Parazelluläre Permeabilität nach Hypoxie/Reoxygenierung - Einfluß von Superoxiddismutase**

Die Fluoreszein-Permeabilität wurde nach Hypoxie/Reoxygenierung bestimmt und mit der normoxischen Inkubator-Kontrolle verglichen (Abb. 3.15). Um den Einfluß von ROS auf die Permeabilität zu überprüfen, wurde SOD während der Hypoxie/Reoxygenierung in die Inkubationslösung gegeben (beidseits des Filters; Aktivitätskonzentration = 50 U/ml). GKEZ wurden vor Beginn der Inkubation in PBS mit AZ kokultiviert (Kokultur ohne morphologischen Kontakt). Der Permeabilitätskoeffizient von Fluoreszein betrug vor jeglicher Behandlung  $0,8 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$  (=100%). Nach 1 h Hypoxie mit 0,5 h Reoxygenierung kam es zu einer starken Erhöhung der Permeabilität (auf  $511 \pm 201\%$ ). Die Permeabilität unterschied sich dabei von der normoxischen Kontrolle signifikant ( $p=0,002$ ). In der normoxischen Kontrolle (1,5 h in PBS) war die Permeabilität im Vergleich zu den Werten vor jeglicher Behandlung leicht erhöht (auf  $132 \pm 20\%$ ); die Zugabe von SOD führte zu keiner signifikanten Veränderung der Permeabilität ( $123 \pm 23\%$ ). Die Zugabe von SOD während der Hypoxie/Reoxygenierung hatte einen protektiven Effekt auf die GKEZ: Der nach Hypoxie/Reoxygenierung beobachtete Anstieg der Permeabilität wurde signifikant reduziert (auf  $184 \pm 49\%$ ,  $p=0,005$ ). Diese Wirkung von SOD läßt auf eine Beteiligung von  $\cdot\text{O}_2^-$  an der Erhöhung der Permeabilität nach Hypoxie/Reoxygenierung schließen.

### **3.10 Aktivität antioxidativer Enzyme und Lipidperoxidation in vivo**

Um einen Anhalt für das antioxidative Potential in vivo zu erhalten, wurden im Gehirnhomogenat von Ratten die Aktivitäten antioxidativer Enzyme sowie die Lipidperoxidation bestimmt. Die Aktivitäten betrugen im Gehirn 58 Wochen alter Ratten für CuZnSOD  $3.977 \pm 0.08 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , MnSOD  $0.023 \pm 0.017 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  und GPx  $44.438 \pm 3.257 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  ( $n=4$  für alle Enzyme). Im Cerebrum von Ratten wurde 3 d post natum ein Malondialdehyd-Gehalt von  $3,31 \pm 0,66 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $n=3$ ) gemessen.



**Abb. 3.15** Fluorescein-Permeabilität durch GKEZ nach 1 h Hypoxie mit Reoxygenierung von 0,5 h (Hyp/Reox) im Vergleich zur normoxischen Behandlung (Normoxie), jeweils ohne bzw. mit SOD. Angaben im Vergleich zur Kontrolle (=100%). MW $\pm$ SD. n=5 für Normoxie $\pm$ SOD; n=8 für Hyp/Reox; n=6 für Hyp/Reox+SOD. \*\*p<0,01 im Vergleich zu Normoxie; ## p<0,01 im Vergleich zu Hyp/Reox (Mann-Whitney Rangsummentest).

## 4 Diskussion

### 4.1 Relevanz von Untersuchungen in vitro für Vorgänge in vivo

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen GKEZ und AZ in bezug auf das antioxidative Potential wurde ein in vitro-Modell der BHS verwendet. Deshalb soll einleitend die Relevanz von in vitro-Modellen der BHS für die Vorgänge in vivo diskutiert werden. Untersuchungen zu Aufbau und Funktion der BHS sind grundsätzlich an folgenden Modellen möglich: Studien in vivo am Menschen bzw. am Tier (z. B. Injektionen von Substanzen in die Arteria carotis), Studien in vitro mit isolierten Gehirnapillaren bzw. Zellkulturen aus primären GKEZ oder GKEZ aus einer Zelllinie (Pardridge, 1991). Je weiter die Modelle von der Situation in vivo entfernt sind, desto reduziertere Modelle der in vivo-Situation repräsentieren sie. Dies impliziert einerseits eine bessere Untersuchbarkeit von Einzelaspekten. Andererseits nimmt die Übertragbarkeit der Modelle auf die eigentlich interessierende Lage am Menschen ab. Letztendlich müssen die im reduzierten Modell erlangten Ergebnisse an komplizierteren in vivo-Modellen validiert werden.

Mit dem hier verwendeten Kokultur-Modell der BHS aus immortalisierten GKEZ und AZ wird am 'reduziertesten' Pol der biologischen Modelle der BHS operiert. Dies erscheint gerechtfertigt, da Einflüsse von AZ auf GKEZ und der Vergleich zwischen Mono- und Kokultivierung in bezug auf das antioxidative Potential nur auf diese Weise untersucht werden können. In vivo sind spezifische Bestimmungen der Enzymaktivitäten von GKEZ bzw. AZ unmöglich. Dagegen sind die Ebenen der mRNA-Expression bzw. Enzymproteine mittels in situ-Hybridisierung/single-cell RT-PCR bzw. der Immunohistochemie in vivo zugänglich.

Andererseits mangelt es dem hier verwendeten in vitro-Modell der BHS aus GKEZ und AZ am Einfluß von anderen Zellen, wie z. B. Neuronen, die wie AZ in GKEZ typische Eigenschaften der BHS induzieren ( $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase; Tontsch und Bauer, 1991). Weiterhin sind GKEZ in Zellkultur gewöhnlich keinem Scherstreß ausgesetzt, wie er in vivo auftritt und welcher GKEZ strukturell und funktionell beeinflußt. So führt Scherstreß z. B. zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B bzw. AP-1 (Lan et al., 1994) sowie zur Induktion von MnSOD (Topper et al., 1996) und CuZnSOD (Inoue et al., 1996a). Neuere Modelle der BHS können diesen Scherstreß simulieren (Stanness et al., 1996). Weiterhin unterscheiden sich kultivierte GKEZ und

AZ von denjenigen in vivo durch Schädigungen auf Grund des Isolationsstresses sowie Kultivierungsbedingungen, die von den in vivo-Verhältnissen abweichen. Subkultivierung von Zellen kann außerdem zur reduzierten Expression von typischen Eigenschaften führen.

Auf die Begrenztheit von in vitro-Systemen zur Untersuchung ischämischer Schädigungen weist Choi (1990) hin. Neben den Vorteilen, wie bessere Kontrollierbarkeit der Variablen, quantitativ und zeitlich exakte Applikation von Pharmaka, geringere Kosten sowie Einschränkung von Tierversuchen, mangelt es den Systemen in vitro an verschiedenen Merkmalen einer Ischämie in vivo. Eine Hypoxie stellt keine Ischämie/Reperfusion im eigentlichen Sinne dar, da in der Regel weder das Blut noch das Fließen des Blutes (Scherstreß) simuliert werden. Es kommt in vitro zu einer wesentlich geringeren extrazellulären Anhäufung von Metaboliten wie  $H^+$ ,  $K^+$ , Laktat, von Neurotransmittern wie Glutamat und zu keinem Abfall in der extrazellulären Konzentration von  $Ca^{2+}$ , da die Zellen in vitro von einem Überschuß an Medium umgeben sind. Im Vergleich zur Situation in vivo werden in vitro eine andere Pharmakokinetik und -dynamik sowie kein Anstieg des (intrakraniellen) Druckes gefunden.

Obwohl diese Einschränkungen auch auf das hier verwendete System zutreffen, ist das Kokultur-Modell der BHS für die Untersuchung des antioxidativen Potentials in der Wechselwirkung zwischen GKEZ und AZ sowie während Hypoxie/Reoxygenierung gut geeignet. Soweit existent, sollen in vivo-Daten zur Validierung der experimentellen in vitro-Befunde herangezogen werden.

#### **4.2 Astrozyten besitzen in Monokultur ein höheres antioxidatives Potential als Gehirnapillarendothelzellen**

Bisher wurden die antioxidativen Enzyme (Aktivitäten, Gehalt an Enzymprotein bzw. an mRNA) in Monokulturen von GKEZ und AZ nicht vergleichend untersucht. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlußfolgert werden, daß AZ auf Grund ihrer höheren Aktivität von MnSOD, Cat und GPx ein höheres antioxidatives Potential als GKEZ besitzen. Dieses Resultat wird durch einen nachweisbaren Gehalt an GSSG in monokultivierten GKEZ, nicht jedoch AZ, unterstützt. Außerdem sind in monokultivierten AZ im Gegensatz zu GKEZ MnSOD-positive, mitochondrienartige Strukturen immunozytochemisch nachweisbar, obschon ein Vergleich der Immunoreaktivität beider Zelltypen nur begrenzt möglich ist. Die stärkste MnSOD-Immunoreaktivität zeigt unter den glialen Zelltypen die Mikroglia. Da der Anteil dieser

Zellen in den primären AZ-Kulturen gering ist (wie mit GFAP- und ILB4-Färbung festgestellt), dürfte der Einfluß auf die Enzymaktivität bzw. den mRNA-Gehalt von MnSOD vernachlässigbar gering sein. AZ besitzen weiterhin einen höheren Gehalt an MnSOD-mRNA, bezogen auf die Gesamt-RNA, als GKEZ.

In vivo-Daten stimmen mit diesen in vitro-Untersuchungen überein. Moreno et al. (1995) berichten in einer immunohistochemischen Studie im Gehirn der Ratte über hohe Cat-Immunoreaktivität von AZ, im besonderen an deren pialen und vaskulären Endfüßen, während in GKEZ keine Immunoreaktivität darstellbar ist. Damier et al. (1993) beobachten eine Beschränkung der GPx-Immunoreaktivität auf AZ. Im Widerspruch zu den höheren Aktivitäten antioxidativer Enzyme in AZ im Vergleich mit GKEZ zeigen AZ unter Kontrollbedingungen eine stärkere Membran-Lipidperoxidation als GKEZ, wenn der Proteingehalt als Bezugsgröße herangezogen wird. AZ sind, im Gegensatz zu GKEZ, morphologisch durch zahlreiche Ausläufer und Endfüße sowohl in vivo als auch in vitro charakterisiert. Folglich besitzen AZ ein ungünstigeres Oberflächen/Volumen-Verhältnis als GKEZ. Da die Zellmembran zu einem großen Teil aus Lipiden besteht, muß die Membran-Lipidperoxidation, wenn sie auf das Protein bezogen wird, in AZ höher sein. Wahrscheinlich würde der Bezug der Lipidperoxidation auf den Lipidgehalt zu einer geringeren Lipidperoxidation in AZ als in GKEZ führen.

#### **4.3 Gehirnkapillarendothelzellen in Monokultur sind empfindlicher gegenüber Hypoxie/Reoxygenierung als Astrozyten**

Zusätzlich zu den höheren Aktivitäten antioxidativer Enzyme widerstehen AZ hypoxischem Streß stärker als GKEZ, wenn die Änderung des antioxidativen Potentials betrachtet wird. Einzig die Aktivität von GPx sinkt in AZ während 2 h Hypoxie signifikant. Im Gegensatz dazu sind in GKEZ CuZnSOD und GPx signifikant in ihrer Aktivität vermindert. Nach 0,5 h Reoxygenierung erreichen die Aktivitäten von CuZnSOD, MnSOD und Cat in GKEZ die Werte der normoxischen Kontrolle, während in AZ die CuZnSOD-Aktivität abnimmt. Dieser Trend der GKEZ zur Normalisierung des antioxidativen Potentials während Reoxygenierung hält an. Nach 1 h Reoxygenierung hat auch die Aktivität von GPx wieder die Werte der normoxischen Kontrolle erreicht. Folglich sind AZ einerseits weniger empfindlich gegenüber Hypoxie als GKEZ, andererseits vermögen GKEZ ihr antioxidatives Potential während der Reoxygenierung schneller als AZ zu normalisieren.

Unsere Ergebnisse stimmen prinzipiell mit Angaben aus der Literatur überein,

obwohl bisher Hypoxie/Reoxygenierung entweder in monokultivierten GKEZ oder monokultivierten AZ untersucht wurden und die Ergebnisse auf Grund unterschiedlicher Medien, Hypoxie-Bedingungen und Benutzung von Zellen aus verschiedenen Spezies nicht untereinander vergleichbar sind. Plateel et al. (1995) und Rabin et al. (1996) beschreiben einen Abfall der Aktivität antioxidativer Enzyme in GKEZ nach jeweils 12 h Hypoxie bzw. Anoxie. In bezug auf die SOD-Aktivität unterscheiden beide Autoren nicht zwischen den Isoenzymen. Unsere Untersuchungen zeigen ebenso einen Abfall der Gesamt-SOD-Aktivität (CuZnSOD+MnSOD-Aktivität) nach Hypoxie. Die experimentellen Ergebnisse zu den AZ entsprechen Angaben Copins et al. (1992), die einen hohen Widerstand von AZ gegenüber hypoxischem Streß von 15 h Dauer schildern. Sie beobachten keine Veränderung in den Aktivitäten antioxidativer Enzyme, einzig die Aktivität von MnSOD nimmt in der Reoxygenierungsphase ab, was auch in unseren Untersuchungen gefunden wird.

Der signifikante Anstieg der MnSOD-Aktivität nach 2 h Hypoxie in unseren Experimenten stimmt mit in vivo-Ergebnissen überein, obwohl diese aus methodischen Gründen ausschließlich mit Veränderungen der mRNA bzw. des Enzymproteins von MnSOD befaßt sind. Nach einer 4-Gefäß-Okklusion im Gehirn der Ratte zeigen Liu et al. (1993) im Hippocampus eine starke Immunoreaktivität für CuZnSOD und MnSOD in AZ nach 10 min Ischämie mit Reperfusion. Matsuyama (1996) hat die Veränderung in der mRNA-Expression (mittels in situ-Hybridisierung) und in der Immunoreaktivität von CuZnSOD und MnSOD nach einer transienten globalen Ischämie im Hippocampus der Wüstenspringmaus untersucht. Sublethale ischämische Insulte, welche eine Toleranz gegenüber nachfolgenden ischämischen Episoden induzieren, führen zu einer spezifischen Induktion von MnSOD-Protein durch eine verstärkte MnSOD-mRNA-Expression ohne Veränderungen in der CuZnSOD der Neuronen der CA1 Region. Ein Anstieg in der MnSOD-Immunoreaktivität nach sublethaler Ischämie kann auch für AZ gezeigt werden (Kato et al., 1995). Möglicherweise verursachen gebildete ROS die Induktion der MnSOD. Ohtsuki et al. (1992) erzeugten eine Toleranz gegenüber nachfolgender zerebraler Ischämie in hippocampalen Neuronen der Wüstenspringmaus, indem sie zuvor in der Hippocampusformation das Enzymprotein von MnSOD durch Generierung von oxidativem Streß erhöhten (Diethyldithiocarbamat; SOD-Inhibitor). Bei myokardialer Ischämie/Reperfusion wird ein ähnliches Ergebnis gefunden (Das et al., 1993). Die Verstärkung der Expression und Aktivität von Cat und

MnSOD durch wiederholte Ischämie/Reperfusion ist mit einer geringeren Sensitivität gegenüber erneuter Ischämie/Reperfusion verbunden. Folglich ermöglicht die Induktion von MnSOD durch oxidativen Streß während Ischämie/Reperfusion einen verstärkten Widerstand von Zellen gegenüber nachfolgender Ischämie und stellt daher ein entscheidendes Phänomen im Rahmen der Präkonditionierung dar.

Verschiedene Mechanismen, die zu der beobachteten erhöhten MnSOD-Aktivität nach Hypoxie führen, können angenommen werden. Mögliche Mediatoren sind ROS, welche in der Hypoxie generiert werden. Yang et al. (1996) zeigen die Produktion von Hydroxyl-Radikalen bei zerebraler Ischämie der Ratte. Eine Erhöhung der Aktivität der Xanthin-Oxidase während Hypoxie oder Anoxie in Endothelzellen (Zweier et al., 1994; Poss et al., 1996) wird ebenfalls berichtet. Die gebildeten ROS, im besonderen  $\text{H}_2\text{O}_2$ , vermögen spezifisch MnSOD (Aktivität/Enzymprotein) zu erhöhen sowie CuZnSOD (Aktivität/Enzymprotein) in AZ bereits innerhalb von 4 h zu senken (Pinteaux et al., 1996; Warner et al., 1996).

Im Gegensatz dazu berichten Kong und Fanburg (1992) einen Anstieg im Enzymprotein der CuZnSOD von Endothelzellen während Anoxie bzw. nach Inkubation mit  $\cdot\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , der mit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) gemessen wurde. Wenn ROS, wenigstens teilweise, für die erhöhte MnSOD-Aktivität verantwortlich sein sollten, müßte nach Kong und Fanburg in GKEZ auch ein Anstieg der CuZnSOD-Aktivität beobachtbar sein. Jedoch wird von diesen Autoren nur die Menge des Enzymproteins an CuZnSOD untersucht und in vitro-Experimente zeigen, daß CuZnSOD durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\cdot\text{O}_2^-$  inaktiviert wird, während MnSOD von diesen nicht beeinträchtigt wird (Sinet und Garber, 1981). Diese Inaktivierung der CuZnSOD durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\cdot\text{O}_2^-$  mit nachfolgender Proteolyse des Enzymproteins wird ebenfalls in Erythrozyten festgestellt (Salo et al., 1990). Folglich könnte die in unseren Untersuchungen gefundene Abnahme der CuZnSOD-Aktivität in GKEZ von einem Anstieg des Enzymproteins begleitet sein.

Neben ROS sind  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-1 bekannte Induktoren der MnSOD (Wong und Goeddel, 1988). Die Induktion wird dabei bereits nach 1 h Inkubation beobachtet (Wong, 1995). Eine Erhöhung der MnSOD-Aktivität durch  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-1 $\beta$  wird in den in unseren Experimenten verwendeten GKEZ und AZ in orientierenden Experimenten bereits nach 2-6 h gefunden, wobei die Erhöhung in den GKEZ deutlich ausgeprägter

als in den AZ ist. Die Produktion von Zytokinen nach hypoxischer oder ischämischer Schädigung in vivo ist bekannt (TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1, Saito et al., 1996; Yoshimoto et al., 1997). GKEZ sowie AZ sind bei transienter zerebraler Ischämie zur Bildung von TNF- $\alpha$  in der Lage (Uno et al., 1997). Deshalb wäre die Synthese von Zytokinen durch GKEZ bzw. AZ in Monokultur während Hypoxie mit einem Feedback auf die produzierenden Zellen selbst möglich (autokrine Regulation). Diese hypothetische Rolle von Zytokinen wird durch in vivo-Experimente unterstützt, die eine Protektion gegenüber zerebraler Ischämie nach Behandlung mit IL-1 (CA1-Neuroprotektion bei der Wüstenspringmaus; Ohtsuki et al., 1996) bzw. TNF- $\alpha$  (Reduktion der Infarkt-Grösse bei Mäusen; Nawashiro et al., 1997) zeigen.

Die Promoterregion des MnSOD-Gens (Ho et al., 1991) enthält vier potentielle Bindungsregionen für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Schmedtje et al. (1997) berichten desweiteren, daß in humanen umbilikalen Venenendothelzellen die Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B (im besonderen Untereinheit p65, RelA) nach 2 h Hypoxie zunimmt, was zu einer nachfolgend erhöhten Transkription und Translation von Cyclooxygenase-2 führt. Deshalb wurde NF- $\kappa$ B als Mediator für die Erhöhung der MnSOD-Aktivität während Hypoxie postuliert.

Die aus diesem Grunde durchgeführten Analysen der NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität unterstützen diese Hypothese nicht, wird doch ein gegensätzliches Verhalten von MnSOD-Aktivität und NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität während Hypoxie/Reoxygenierung gefunden. Kommt es in der Hypoxie zu einem Anstieg der MnSOD-Aktivität in GKEZ und AZ, so nimmt die NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität in der Hypoxie ab (AZ) bzw. verändert sich nicht (GKEZ). In der Reoxygenierung wird dagegen ein Abfall der MnSOD-Aktivität in GKEZ und AZ und ein sehr starker Anstieg der NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität in den GKEZ gefunden. In den AZ verändert sich die NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität in der Reoxygenierung nicht. Möglicherweise wird durch die Probenentnahme nach 2 h Hypoxie der Anstieg der NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität in der frühen Hypoxie nicht erfaßt. Pyrrolidin-Dithiocarbamat, ein Inhibitor der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, hat keinen signifikanten Einfluß auf den Anstieg der Aktivität von MnSOD in der Hypoxie. Dies ist ein weiterer Anhaltspunkt dafür, daß die Expression von MnSOD während Hypoxie/Reoxygenierung nicht über NF- $\kappa$ B reguliert wird.

Unsere Ergebnisse stehen mit Literatur-Angaben im Einklang, die im Gegensatz



zu Schmedtje et al. (1997) einen Abfall der Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in der Hypoxie und einen Anstieg in der Reoxygenierung berichten (Müller et al., 1997). NF- $\kappa$ B wird nach Müller et al. allgemein durch oxidativen Streß aktiviert und durch Antioxidantien inaktiviert. Weiterhin berichten sie, daß der Transkriptionsfaktor AP-1, im Gegensatz zu NF- $\kappa$ B, durch Antioxidantien/Hypoxie aktiviert und durch Oxidantien/Reoxygenierung inaktiviert wird. Da in der Promoterregion der MnSOD ebenfalls eine Bindungsregion für AP-1 vorhanden ist, könnte die Erhöhung der MnSOD-Aktivität in der Hypoxie durch AP-1 vermittelt sein, vorausgesetzt, daß es sich dabei um eine verstärkte Transkription handelte. Yu et al. (1995) zeigen in AZ bereits nach 30 min Hypoxie einen Anstieg der mRNA von c-Fos, das als Heterodimer mit Proteinen der Jun-Familie den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden kann (Pennypacker, 1997). Dieser Befund unterstützt die mögliche Bedeutung von AP-1.

In vivo kann nach transienter fokaler Ischämie ein Anstieg der NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität im ischämischen Cortex, allerdings erst nach 5 d, gezeigt werden (Salminen et al., 1995). Morishita et al. (1997) erzielen durch den Einsatz von NF- $\kappa$ B-decoy (-'Köder'), die den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B binden und inaktivieren, in der Reperusionsphase nach myokardialer Ischämie eine Verminderung des geschädigten Areals. Dieser protektive Effekt durch Blockade der Wirkung von NF- $\kappa$ B könnte wahrscheinlich nicht erreicht werden, wenn damit zugleich eine MnSOD-Induktion verhindert würde (protektiver Effekt von MnSOD, z. B. bei Präkonditionierung).

In bezug auf die destruktive Wirkung freier Radikale, die sich z. B. in der Zunahme der Membran-Lipidperoxidation zeigt, sind AZ weniger empfindlich gegenüber einer Hypoxie mit nachfolgender Reoxygenierung. Nach Hypoxie und 1 h Reoxygenierung ist die Lipidperoxidation in GKEZ signifikant erhöht, während in AZ nur ein leichter Anstieg zu verzeichnen ist. Unsere Ergebnisse stimmen mit in vivo-Untersuchungen überein (Bromont et al., 1989), die einen Anstieg der Lipidperoxidation innerhalb von 8 und 72 h der Rezirkulationsphase nach 30 min Vorderhirn-Ischämie in der Ratte berichten. Weiterhin zeigen die gemessenen Erhöhungen der Lipidperoxidation nach Hypoxie/Reoxygenierung indirekt, daß freie Radikale unter diesen Bedingungen gebildet worden sind.

#### **4.4 Kokultivierung von Gehirnkapillarendothelzellen und Astrozyten führt zur Erhöhung des antioxidativen Potentials**

Die Experimente mit Monokulturen von GKEZ und AZ weisen ein höheres antioxidatives Potential von AZ, verglichen mit GKEZ, nach. Die daraus folgende Hypothese einer Unterstützung des antioxidativen Potentials von GKEZ durch Kokultivierung mit AZ wird mit den Kokultur-Experimenten bestätigt. Kokultivierung von GKEZ mit AZ erhöht die Aktivität der antioxidativ wirksamen Enzyme sowie des Gehaltes an Enzymprotein und mRNA von MnSOD in beiden Zelltypen. Die Erhöhung des Gehaltes an MnSOD-Protein und MnSOD-mRNA kann sowohl für Kokulturen mit als auch ohne morphologischen Kontakt gezeigt werden.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denjenigen von Plateel et al. (1995), welche keine Veränderungen in den Aktivitäten antioxidativer Enzyme in mit AZ kokultivierten GKEZ (ohne morphologischen Kontakt) im Vergleich zu monokultivierten GKEZ finden. Da in unseren Experimenten ein homologes Kokultur-Modell benutzt wurde (Ratte), ist die fehlende Erhöhung der Aktivitäten bei Plateel et al. wahrscheinlich auf die Benutzung eines heterologen Kokultursystems zurückführbar (bovine GKEZ; AZ aus der Ratte), welches spezies-spezifische Wechselwirkungen zwischen GKEZ und AZ verhindert. Die Zunahme der MnSOD-Aktivität, -Immunoreaktivität und -mRNA in GKEZ ist möglicherweise auf eine Erhöhung der Mitochondrienzahl in GKEZ durch Kokultivierung mit AZ zurückführbar, wie sie von Hayashi et al. (1997) für umbilikale Venenendothelzellen bei morphologischem Kontakt mit AZ gezeigt wird.

Bedeutet die Kokultivierung mit ihrem Anstieg der Enzymaktivitäten eine Annäherung an die in vivo-Situation? Shukla et al. (1995) beschreiben eine ca. doppelte Aktivität von GPx sowie eine ähnliche Aktivität der Gesamt-SOD in mikrovaskulären Gefäßen aus dem Gehirn der Ratte im Vergleich mit Hirnhomogenat. Wenn die in unseren Experimenten gemessenen Aktivitäten antioxidativer Enzyme in Kokultur aus GKEZ und AZ mit den Enzymaktivitäten im Hirnhomogenat adulter Ratten verglichen werden, kann geschlußfolgert werden, daß die Kokultivierung zu einer Angleichung der Verhältnisse an die in vivo-Situation führt.

Im Hinblick auf die für die Erhöhungen der Enzyme verantwortlichen Faktoren kommen im Kokultur-Modell ohne morphologischen Kontakt zwischen GKEZ und AZ nur lösliche Faktoren in Betracht. Wachstumsfaktoren und Zytokine könnten als

Mediatoren die Erhöhung der Enzymaktivitäten im Vergleich zu Monokulturen vermitteln. Yang und de Bono (1997) zeigen, daß vaskulärer Endothelzell-Wachstumsfaktor sowie saurer und basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor die Empfindlichkeit von Endothelzellen gegenüber oxidativem Streß senken und den Gehalt an GSH erhöhen können. bFGF wird von Endothelzellen und AZ in vitro sezerniert (Sato et al., 1989). Außerdem kann bFGF bei Applikation nach fokaler zerebraler Ischämie bei der Ratte zu einer Reduktion der Infarktgröße und Verminderung der neurologischen Defizite führen (Fisher et al., 1995; Kawamata et al., 1996), möglicherweise durch eine Erhöhung des antioxidativen Potentials.

Da in unseren Untersuchungen der GSH-Gehalt sowohl in kokultivierten GKEZ als auch in kokultivierten AZ im Vergleich zur jeweiligen Monokultur abgenommen hat, könnten neben Wachstumsfaktoren andere Faktoren, wie TNF- $\alpha$  oder IL-1, eine Rolle spielen. TNF- $\alpha$  führt zu einer Abnahme des GSH-Gehaltes (Yang und de Bono, 1997) und, wie IL-1, zu einer Induktion von MnSOD (Wong und Goeddel, 1988), welche unter den untersuchten antioxidativen Enzymen im Vergleich zur Monokultur am stärksten in der Aktivität erhöht ist. Die Annahme von Zytokinen als Mediatoren wird durch eine höhere Lipidperoxidation in GKEZ und AZ im Kokultur-Modell ohne morphologischen Kontakt im Vergleich zur entsprechenden Monokultur unterstützt (Blasig et al., 1998). Zytokine sind bereits von anderen Autoren als Mediatoren in der Wechselwirkung von kokultivierten GKEZ und AZ beschrieben worden. So zeigen Sun et al. (1997), daß von AZ sezerniertes IL-6 den Na-K-Cl-Kotransport in GKEZ zu regulieren vermag. Takemoto et al. (1994) charakterisieren ebenfalls IL-6 als denjenigen Faktor, welcher von einer humanen Glioma-Zelllinie sezerniert wird und zur Erhöhung der Aktivität von alkalischer Phosphatase in Endothelzellen aus der Kälberlunge führt.

Die orientierenden Experimente, in denen die Potenz von IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  sowie bFGF/ECGF zur Erhöhung der Aktivität antioxidativer Enzyme in monokultivierten GKEZ und AZ überprüft wird, unterstützen die Rolle von IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  als Mediatoren erhöhter MnSOD-Aktivität in Kokultur. Mit bFGF/ECGF-Inkubation wird jedoch keine Erhöhung des antioxidativen Potentials erreicht. Im Gegenteil dazu kommt es zu einer signifikanten Abnahme der CuZnSOD-Aktivität in GKEZ nach 3 d Inkubation. Somit sind bFGF/ECGF als Mediatoren unwahrscheinlich. Allerdings ist es möglich, daß veränderte Inkubationszeiten und Konzentrationen die Aktivitäten der untersuchten

Enzyme erhöhen könnten. Die endgültige Klärung der Frage, ob Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine bei der Erhöhung der Aktivitäten antioxidativer Enzyme in Kokultur von Bedeutung sind, wäre durch Inkubation mit Antikörpern möglich, welche diese Wachstumsfaktoren/Zytokine inaktivieren können.

In demjenigen Kokultur-Modell, bei welchem AZ auf der gegenüberliegenden Seite des Filters kultiviert werden, bestehen morphologische Kontakte zwischen GKEZ und AZ (gezeigt durch GFAP-Immunoreaktivität). In diesem Kokultur-Modell ist aus methodischen Gründen (zu wenig gewinnbares Material für biochemische Messungen) eine Bestimmung der Aktivitäten antioxidativer Enzyme nicht möglich. Bis auf den gezeigten höheren Gehalt an MnSOD-mRNA und -Enzymprotein in kokultivierten GKEZ im Vergleich mit monokultivierten GKEZ kann folglich kein zuverlässiger Vergleich zwischen dem Kokultur-Modell mit morphologischem Kontakt und der Monokultur durchgeführt werden.

Widersprüchlich erscheint der Anstieg der Lipidperoxidation im Kokultur-Modell ohne morphologischen Kontakt sowohl in GKEZ als auch AZ im Vergleich mit der entsprechenden Monokultur, jeweils unter Kontrollbedingungen. Wie bereits oben diskutiert, deutet dies auf eine Wirkung von Zytokinen hin. Diese Annahme wird durch den Anstieg der GFAP-Immunoreaktivität (Marker für die Aktivierung von AZ; Pennypacker, 1997) in kokultivierten AZ unterstützt (Kokultur mit morphologischem Kontakt). Der Malondialdehyd-Gehalt im Rattengehirn als Maß der Lipidperoxidation in vivo liegt deutlich höher als der in den Zellkulturen aus GKEZ bzw. AZ beobachtete. Obwohl es sich hierbei um Homogenate sämtlicher Zellen des ZNS handelt, so könnte doch behauptet werden, daß der Anstieg der Lipidperoxidation in Kokultur im Vergleich mit den entsprechenden Monokulturen eine Annäherung an die Situation in vivo darstellt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Kokultivierung von GKEZ und AZ zu einem Anstieg des antioxidativen Potentials in beiden Zelltypen führt.

#### **4.5 Kokultivierung von Gehirnkapillarendothelzellen und Astrozyten führt zu geringerer Sensitivität gegenüber Hypoxie/Reoxygenierung**

Der Anstieg der Aktivitäten antioxidativer Enzyme durch Kokultivierung führt zu einer Reduktion der in der entsprechenden Monokultur festgestellten Verminderung der Aktivitäten während Hypoxie. Dieses Phänomen trifft besonders für die GKEZ zu. Der unter Bedingungen der Monokultur gefundene Anstieg der MnSOD-Aktivität in der Hypoxie wird in Kokultur nicht gefunden. Dies ist vermutlich auf die höhere Aktivität der Gesamt-SOD sowie den höheren Gehalt an MnSOD-Enzymprotein und -mRNA vor Beginn der Hypoxie und mithin ausreichende Kapazität zum Abbau von  $\cdot\text{O}_2^-$  zurückzuführen. Unter den Bedingungen der Kokultivierung kommt es zu einem geringeren Anstieg der Lipidperoxidation nach Hypoxie/Reoxygenierung (im besonderen in GKEZ), verglichen mit entsprechend behandelten Monokulturen. Dies unterstützt die Hypothese eines protektiven Effektes der Kokultivierung.

#### **4.6 Konsequenzen für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke**

Zum ersten Mal wurden in dieser Arbeit unterstützende Effekte von AZ auf das antioxidative Potential von GKEZ gezeigt. Welche Konsequenzen können diese Phänomene für die Funktion der BHS haben? Einerseits ist die Radikalbildung bereits unter physiologischen Bedingungen in der BHS hoch und die gebildeten ROS können die BHS öffnen. Deshalb ist die ungestörte Funktion der BHS, d. h. im wesentlichen die Dichtheit, von einem hohen antioxidativen Potential als Grundvoraussetzung abhängig (Betz, 1993). Andererseits separiert die BHS als 'antioxidative BHS' das empfindlich auf ROS reagierende Gehirngewebe vom Blut als Ort einer kontinuierlichen starken Radikalgenerierung. Folglich muß das hohe antioxidative Potential der BHS als eine weitere typische Eigenschaft der BHS betrachtet werden, die von AZ induziert wird.

Während pathophysiologischer Zustände, im besonderen Ischämie/Reperfusion in vivo sowie Hypoxie/Reoxygenierung in vitro, führt die exzessive Produktion von freien Radikalen zu einer Schädigung von GKEZ und mithin der BHS (Martz et al., 1989; Inauen et al., 1990). Dabei ist folgender vermittelnder Mechanismus wahrscheinlich:  $\cdot\text{O}_2^-$  (Crawford et al., 1996) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hastie et al., 1997) führen zu einer Reorganisation von Actin in der Reoxygenierungsphase und mithin zu einer Erhöhung der Permeabilität (Lum et al., 1992). Demgemäß können GKEZ und die BHS mit antioxidativ wirkenden Substanzen geschützt werden (Martz et al., 1989; Giese et al., 1995). In Zellkulturen von GKEZ kommt es durch Reoxygenierung zur Produktion

von  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2^-$  und zu Schädigungen, welche durch Xanthin-Oxidase-Inhibitoren, Eisen-Chelatoren, Radikalfänger, SOD, Cat und GPx vermindert werden können (Michiels et al., 1992; Mertsch et al., 1995; Terada, 1996). ROS vermögen während Hypoxie/Reoxygenierung die Permeabilität von GKEZ-Monolayern zu steigern sowie deren transendothelialen elektrischen Widerstand zu vermindern, was in beiden Fällen als Indikator einer Dysfunktion der BHS betrachtet werden kann. Diese Dysfunktion kann durch applizierte SOD, Xanthin-Oxidase-Inhibitoren und Cat verhindert werden (Inauen et al., 1990; Lum et al., 1992). Für die von uns verwendeten Zellkulturen sind während Hypoxie/Reoxygenierung ähnliche Ergebnisse erhalten worden. Nach Hypoxie/Reoxygenierung steigt die Na-Fluoreszein-Permeabilität deutlich an, was durch Applikation von SOD verhindert werden kann. Auch das Lazaroid U83836E schützt die Integrität der GKEZ-Monolayer während Hypoxie/Reoxygenierung (Giese et al., 1995).

Diese Befunde lassen auf eine protektive Wirkung eines erhöhten antioxidativen Potentials durch Kokultivierung mit AZ schließen. Mit AZ kokultivierte GKEZ müßten in der Lage sein, ihre Dichtheit während Hypoxie/Reoxygenierung länger aufrechtzuerhalten, da sie die gebildeten ROS effektiver zu metabolisieren vermögen. Eben dies wird von Kondo et al. (1996a) berichtet. Im Vergleich mit monokultivierten GKEZ-Monolayern können mit AZ kokultivierte GKEZ ihre Dichtheit während Hypoxie/Reoxygenierung länger aufrechterhalten. Diese Befunde lassen funktionelle Konsequenzen der von uns beobachteten Veränderungen des antioxidativen Potentials durch Kokultivierung als sehr wahrscheinlich erscheinen.

#### **4.7 Bedeutung der in vitro-Untersuchungen für Vorgänge in vivo**

Die Bedeutung der dargestellten Ergebnisse liegt einerseits in der Klärung der physiologischen und pathophysiologischen Wechselwirkungen zwischen GKEZ und AZ in bezug auf antioxidative Schutzmechanismen in der BHS. Diese sind in vivo nur begrenzt untersuchbar. Die Aktivität der Enzyme ist in vivo nicht zellspezifisch zugänglich. Zur Validierung der in vitro erhaltenen Resultate könnten allerdings immunohistochemische Untersuchungen (Kombination von zellspezifischen Antikörpern mit Antikörpern gegen antioxidatives Enzym) und in situ-Hybridisierung (Kombination mit zellspezifischen Antikörpern) die in vitro Experimente ergänzen. Dabei sollten die Experimente jeweils unter Kontrollbedingungen bzw. nach Ischämie/Reperfusion durchgeführt werden. Der Vergleich von mono- und kokultivier-

ten Zellen ist dagegen nur in vitro möglich.

Andererseits ergeben sich Anhaltspunkte für pathophysiologische Zustände des Gehirns wie z. B. die zerebrale Ischämie. Das hohe antioxidative Potential der BHS muß als eine 'conditio sine qua non' ihrer Funktion betrachtet werden. Bisherige in vivo durchgeführte Studien zur Protektion während zerebraler Ischämie dürften ihre protektive Wirkung zum Teil über die Stärkung des antioxidativen Potentials der BHS entfaltet haben (Tirilazad und Pergorgotein; Koroshetz und Moskowitz, 1996). Da AZ wesentlich am antioxidativen Potential der BHS beteiligt sind, könnten therapeutische Maßnahmen auf die Stärkung dieses Potentials der AZ zielen.

Die größten Veränderungen werden für MnSOD beobachtet, die sich mit ihrer mitochondrialen Lokalisation an einem Hauptort der Radikalgenerierung befindet. Durch Aufklärung der in die MnSOD-Induktion involvierten Signalkaskade könnten Möglichkeiten zu klinischer Präkonditionierung gefunden werden, da die Induktion von MnSOD dieses Phänomen experimentell teilweise bewirkt (Matsuyama, 1996). Die Bedeutung der SOD wird durch Studien in vivo gestützt, in denen in der Reperusionsphase applizierte SOD bzw. eine Überexpression von SOD eine Reduktion des Infarktgebietes bewirkt (Inoue et al., 1996b; Keller et al., 1998).

Wenn NF- $\kappa$ B nicht an der Induktion von MnSOD während Ischämie/Reperfusion beteiligt ist, könnte der Einsatz von NF- $\kappa$ B-decoy (-'Köder'), die den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B binden und inaktivieren, in Analogie zur myokardialen auch bei zerebraler Ischämie erfolgversprechend sein (Morishita et al., 1997). In diesem Fall würden nur für den Verlauf des Schlaganfalls ungünstige (induzierbare NOS, Zelladhäsions-Moleküle, Cyclooxygenase-2, IL-1, IL-6, TNF), nicht jedoch günstige Faktoren (MnSOD) in ihrer Transkription gehemmt.

Da das antioxidative Potential in den Zellen der BHS während Hypoxie/Reoxygenierung bzw. Ischämie/Reperfusion sinkt, könnten klinisch zusammen mit Pharmaka zur Verbesserung der zerebralen Durchblutung (wie tPA) Antioxidantien eingesetzt werden, um so die durch ROS bedingte Öffnung der BHS und das konsekutive vasogene Ödem zu vermindern bzw. zu vermeiden. Dies könnte außerdem zu einer Vermeidung der von Wang et al. (1998) berichteten neurotoxischen Wirkung von tPA führen, der bei intakter BHS nicht ins zerebrale Parenchym gelangte. Möglicherweise wäre ebenfalls eine Reduktion von Hämorrhagien, die als Nebenwir-

kung der tPA-Applikation auftreten können, möglich.



## 5 Zusammenfassung

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) wird durch Gehirnkapillarendothelzellen (GKEZ) gebildet. Astrozyten (AZ) können typische Eigenschaften von GKEZ, wie z. B. das Marker-Protein von-Willebrand-Faktor sowie tight junctions, induzieren und demzufolge die Funktion der BHS wesentlich beeinflussen.

Es ist bekannt, daß AZ ein hohes antioxidatives Potential besitzen und Neurone vor oxidativem Streß, wie z. B. reaktiven Sauerstoff-Spezies, schützen können. Obwohl ein hohes antioxidatives Potential für die Funktion der BHS von großer Bedeutung ist, wurde der Einfluß von AZ auf das antioxidative Potential von GKEZ noch nicht untersucht. Bisherige Studien weisen darauf hin, daß AZ während Hypoxie/Reoxygenierung GKEZ-Monolayer schützen können. Da die in der Hypoxie/Reoxygenierung auftretenden Schädigungen von GKEZ zum großen Teil durch reaktive Sauerstoff-Spezies vermittelt sind, wird die Beeinflussung antioxidativer Systeme durch kokultivierte AZ postuliert. Mit dieser Arbeit sollten daher (1) das antioxidative Potential von GKEZ und AZ in Monokultur (2) der Einfluß einer Kokultivierung von GKEZ mit AZ sowie (3) der Einfluß von Hypoxie mit nachfolgender Reoxygenierung auf das antioxidative Potential an einem in vitro-Modell der BHS untersucht werden.

Die experimentellen Arbeiten konzentrierten sich auf die antioxidativ wirksamen Schutzenzyme. Zu diesen gehören die intrazellulären Isoformen der Superoxiddismutase (SOD), zytosolische Kupfer-Zink (CuZnSOD) und mitochondriale Mangan-SOD (MnSOD), sowie Catalase (Cat) und Glutathion-Peroxidase (GPx). Weiterhin wurde der Gehalt an reduziertem und oxidiertem Glutathion, einem zentralen endogenen Antioxidans, bestimmt. Als Marker der Generierung von reaktiven Sauerstoff-Spezies wurde die Lipidperoxidation gemessen.

Es kann erstmals gezeigt werden, daß AZ in Monokultur ein höheres antioxidatives Potential als monokultivierte GKEZ besitzen:

- AZ besitzen höhere Aktivitäten antioxidativer Enzyme (MnSOD, Cat, GPx) als GKEZ. Ebenso ist der Gehalt an MnSOD-mRNA in AZ höher als in GKEZ.
- Die Enzymaktivitäten von Cat, GPx, CuZnSOD fallen während Hypoxie in GKEZ stärker ab als in AZ.

- Die MnSOD-Aktivität ist nach Hypoxie in AZ stärker erhöht als in GKEZ.
- Der Anstieg der Lipidperoxidation nach Reoxygenierung ist in AZ geringer ausgeprägt als in GKEZ.

Da AZ ein hohes antioxidatives Potential besitzen und in vivo GKEZ abluminal bedecken, können sie diese und die BHS vor oxidativem Streß schützen.

Die Promoterregion der MnSOD besitzt mehrere Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B. Deshalb wurde untersucht, ob NF- $\kappa$ B für die Erhöhung der MnSOD-Aktivität während der Hypoxie verantwortlich ist. Wahrscheinlich ist dies nicht der Fall. Diese Schlußfolgerung ergibt sich aus der beobachteten gegenläufigen Veränderung von NF- $\kappa$ B und MnSOD während Hypoxie/Reoxygenierung. Während die Aktivität von MnSOD in GKEZ und AZ in der Hypoxie zunimmt und während Reoxygenierung abnimmt, sinkt die Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in AZ in der Hypoxie und steigt während Reoxygenierung in den GKEZ an.

In homologen Kokulturen von GKEZ und AZ (jeweils aus der Ratte) kann erstmals ein Anstieg des antioxidativen Potentials sowohl in GKEZ als auch in AZ im Vergleich zu den entsprechenden Monokulturen gezeigt werden:

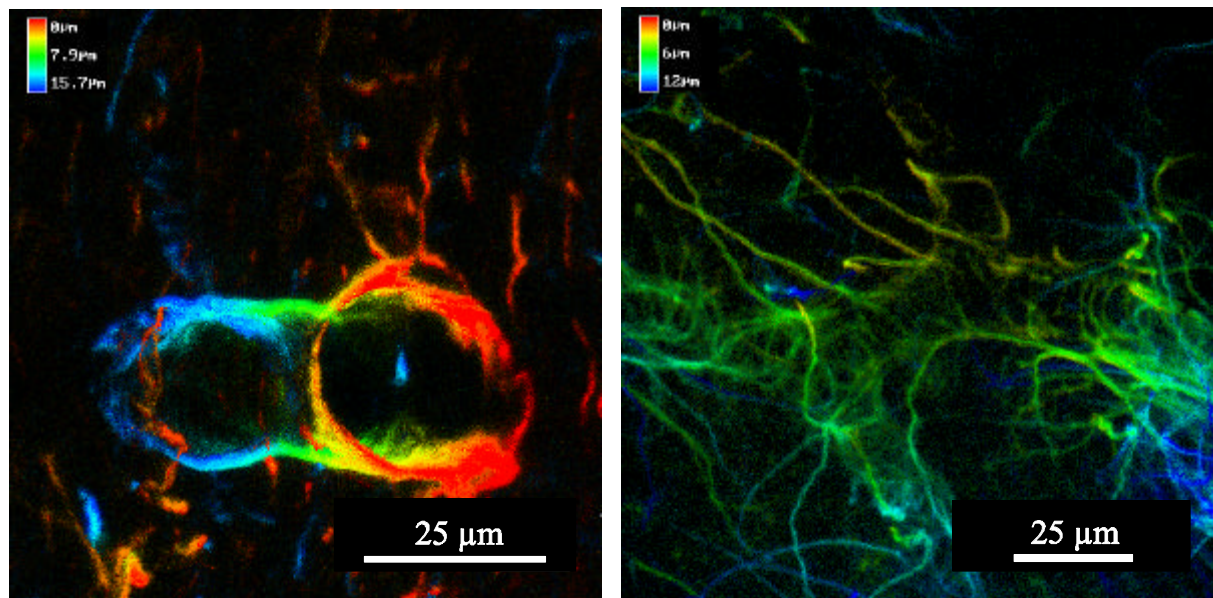
- Die Aktivitäten aller untersuchten antioxidativen Enzyme nehmen in GKEZ und AZ im Vergleich zu den entsprechenden Monokulturen zu.
- Im Falle der MnSOD sind der Gehalt von Enzymprotein (in GKEZ und AZ) und mRNA (in GKEZ), bezogen auf die jeweilige Monokultur, ebenfalls erhöht.
- In monokultivierten GKEZ ist die Aktivität der meisten antioxidativen Enzyme nach Hypoxie reduziert. Durch Kokultivierung mit AZ kann diese Aktivitätsabnahme in GKEZ begrenzt werden.
- Der Anstieg der Lipidperoxidation nach Reoxygenierung wird in kokultivierten GKEZ und AZ im Vergleich zur jeweiligen Monokultur vermindert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Kokultivierung von GKEZ mit AZ das antioxidative Potential in beiden Zelltypen erhöht und folglich GKEZ sowie die BHS gegenüber oxidativem Streß, wie z. B. bei Hypoxie/Reoxygenierung bzw. Ischämie/Reperfusion, schützt. Die Bedeutung der dargestellten Ergebnisse liegt in der Klärung der Wechselwirkung zwischen GKEZ und AZ in bezug auf antioxidative

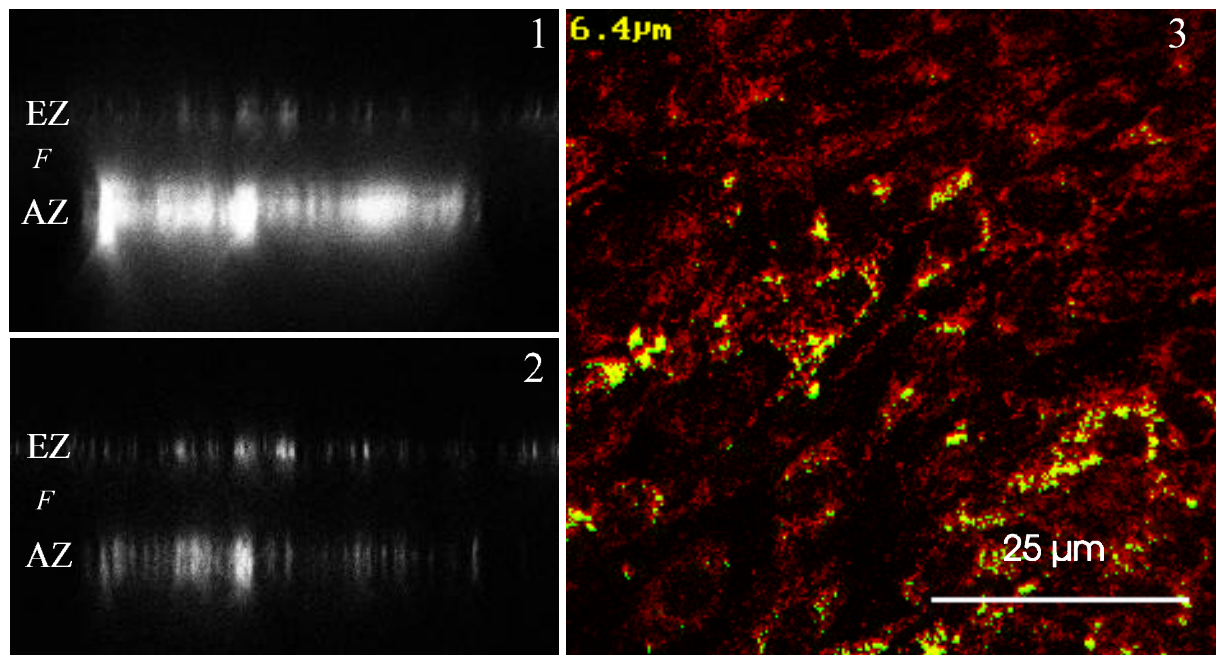
Schutzmechanismen in der BHS. AZ vermögen neben Neuronen auch GKEZ vor reaktiven Sauerstoff-Spezies durch deren Abbau zu schützen.

Weil die Radikalbildung bereits unter physiologischen Bedingungen im Bereich der BHS hoch ist und reaktive Sauerstoff-Spezies die BHS öffnen können, ist die ungestörte Funktion der BHS von einem hohen antioxidativen Potential abhängig. Des weiteren separiert die BHS als 'antioxidative BHS' das gegenüber reaktiven Sauerstoff-Spezies empfindliche Gehirngewebe vom Blut als Ort einer kontinuierlichen Radikalgenerierung. Deshalb muß das hohe antioxidative Potential als eine weitere typische und notwendige Eigenschaft der BHS betrachtet werden, die von AZ beeinflusst wird.

## Anhang



**Abb. 1.1** GFAP-Immunoreaktivität in Gewebeschnitten aus Gehirnen adulter Ratten (Cortex). Darstellung der an die Gefäße grenzenden Endfüße der Astrozyten. Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie; Cy2. Falschfarbendarstellung (Tiefenkodierung).



**Abb. 3.3** GFAP- und MnSOD-Immunoreaktivität in Kokultur aus Gehirndendothelzellen und Astrozyten (mit morphologischem Kontakt). (1) GFAP, Cy2; (2) MnSOD, Cy3; jeweils sagittale Ebene. (EZ) Endothelzellen. (F) Filter. (AZ) Astrozyten. (3) Doppelmarkierung von GFAP (Cy2, grün) und MnSOD (Cy3, rot) auf Ebene der Endothelzellen, transversale Ebene.

## Literaturverzeichnis

- Aebi HE (1987) Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis, Vol. III* (Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M, eds), Weinheim, VCH-Verlagsgesellschaft, pp 273-286
- Asayama K, Burr IM (1985) Rat superoxide dismutases. Purification, labeling, immunoassay, and tissue concentration. *J Biol Chem* 260:2212-2217
- Baethmann A, Schürer L, Unterberg A, Wahl W, Staub F, Kempfski O (1991) Mediators of brain edema in the rat. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 41:310-315
- Beckman JS, Minor RL, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA (1988) Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* 263:6884-6891
- Betz AL (1993) Oxygen free radicals and the brain microvasculature. In: *The Blood-Brain Barrier* (Pardridge WM, eds), New York, Raven Press, pp 303-321
- Betz AL, Goldstein GW, Katzman R (1994) Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers. In: *Basic Neurochemistry* (Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, eds), New York, Raven Press, pp 681-699
- Blanc EM, Toborek M, Mark RJ, Hennig B, Mattson MP (1997) Amyloid  $\beta$ -peptide induces cell monolayer albumin permeability, impairs glucose transport, and induces apoptosis in vascular endothelial cells. *J Neurochem* 68:1870-1881
- Blasig IE, Sporbert A, Utepbergenov DI, Schroeter ML, Mertsch K, Haseloff RF (1998) Cytokine- and hypoxia-induced lipid peroxidation in astrocytes. *Int J Clin Pharmacol Therapeut* 36:112-113
- Blaauwgeers HGT, Vianney de Jong JMB, Verspaget HW, van den Berg FM, Troost D (1996) Enhanced superoxide dismutase-2 immunoreactivity of astrocytes and occasional neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 140:21-29
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7162-7166
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Bromont C, Marie C, Bralet J (1989) Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 20:918-924
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, Mattson MP (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature Med* 2:788-794
- Cadet JL, Sheng P, Epstein C, Hirata H (1996) Nitric oxide and superoxide radicals as mediators of toxicity of amphetamine analogs. In: *Free radicals in brain physiology and disorders* (Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T, eds), New York, Academic Press, pp 441-448
- Cancilla PA, Bready J, Berliner J (1993) Brain endothelial-astrocyte interactions. In: *The Blood-Brain Barrier* (Pardridge WM, eds), New York, Raven Press, pp 25-46
- Choi WD (1990) Limitations of in vitro models of ischemia. In: *Current and Future Trends in Anti-convulsant, Anxiety, and Stroke Therapy*, Wiley-Liss, Inc., pp 291-299
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSH-Px-GI. *J Biol Chem* 268:2571-2576
- Copin JC, Ledig M, Tholey G (1992) Free radical scavenging systems of rat astroglial cells in primary culture: effects of anoxia and drug treatment. *Neurochem Res* 17:677-682

- Crawford LE, Milliken EE, Irani K, Zweier JL, Becker LC, Johnson TM, Eissa NT, Crystal RG, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ (1996) Superoxide-mediated actin response in post-hypoxic endothelial cells. *J Biol Chem* 271:26863-26867
- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neurosci* 52:1-6
- Das DK, Engelman RM, Kimura Y (1993) Molecular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischemia. *Cardiovasc Res* 27:578-584
- Dehouck MP, Dehouck B, Schluep C, Lemaire M, Cecchelli R (1995) Drug transport to the brain: comparison between in vitro and in vivo models of the blood-brain barrier. *Eur J Pharm Sci* 3:357-365
- Desagher S, Glowinski J, Premont J (1996) Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16:2553-2562
- Dirnagl U, Meisel A (1998) Zerebrale Ischämie. In: *Molekulare Medizin* (Ganten D, eds), Berlin, Springer, im Druck
- Dringen R, Hamprecht B (1997) Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* 759:67-75
- Du C, Hu R, Csernansky A, Hsu CY, Choi DW (1996) Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 16:195-201
- Farooqui AA, Haun SE, Horrocks LA (1994) Ischemia and hypoxia. In: *Basic Neurochemistry* (Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, eds), New York, Raven Press, pp 867-883
- Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, Cooper JT, Brostjan C, Bach FH, Winkler H (1995) Inhibition of NF-**B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation**. *Biochem Biophys Res Commun* 214:212-223
- Fisher M, Meadows ME, Do T, Weise J, Trubetsky V, Charette M, Finklestein SP (1995) Delayed treatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:953-959
- Flohé L (1989) The selenoprotein glutathione peroxidase. In: *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects - part A* (Dolphin D, Poulson R, Avramovic O, eds), John Wiley & Sons, pp 643-731
- Gass P (1997) Cerebrale Ischämie und Epilepsie. In: *Klinische Neurobiologie: Molekulare Pathogenese und Therapie von neurologischen Erkrankungen* (Herdegen T, Tölle TR, Bähr M, eds), Heidelberg, Spektrum, pp 189-220
- Giese H, Mertsch K, Blasig IE (1995) Effect of MK-801 and U83836E on a porcine brain capillary endothelial cell barrier during hypoxia. *Neurosci Lett* 191:169-172
- Gorecki M, Beck Y, Hartman JR, Fischer M, Weiss L, Tochner Z, Slavin S, Nimrod A (1991) Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses. *Free Radic Res Commun* 12-13:401-410
- Griffith OW (1990) Glutathione and glutathione disulphide. In: *Methods of Enzymatic Analysis, Vol. VIII* (Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M, eds), Weinheim, VCH-Verlagsgesellschaft, pp 521-529
- Hastie LE, Patton WF, Hechtman HB, Shepro D (1997) Filamin redistribution in an endothelial cell reoxygenation injury model. *Free Radic Biol Med* 22:955-966
- Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi SI, Harada SI, Yamashita J, Yamamoto H (1997) Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19:13-26
- Ho YS, Howard AJ, Crapo JD (1991) Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:278-286
- Hori O, Matsumoto M, Maeda Y, Ueda H, Ohtsuki T, Stern DM, Kinoshita T, Ogawa S, Kamada T (1994) Metabolic and biosynthetic alterations in cultured astrocytes exposed to hypoxia/reoxygenation. *J*

Neurochem 62:1489-1495

- Hurn PD, Kirsch JR, Helfaer MA, Traystman RJ (1996) Brain damage and free radicals. In: Tissue perfusion and organ function. Ischemia/reperfusion injury (Kamada T, Shiga T, McCuskey RS, eds), Amsterdam, Elsevier, pp 71-84
- Inauen W, Payne DK, Kviety PR, Granger DN (1990) Hypoxia/reoxygenation increases the permeability of endothelial cell monolayers: role of oxygen radicals. *Free Radic Biol Med* 9:219-223
- Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG (1996a) Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res* 79:32-37
- Inoue M, Inoue K, Utsumi K (1996b) Cross talk between superoxide and nitric oxide radicals in regulation of neurovascular network. In: Free radicals in brain physiology and disorders (Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T, eds), New York, Academic Press, pp 119-127
- Jesberger JA, Richardson JS (1991) Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int J Neurosci* 57:1-17
- Jornot L, Junod AF (1995) Differential regulation of glutathione peroxidase by selenomethionine and hyperoxia in endothelial cells. *Biochem J* 306:581-587
- Juurlink BHJ (1997) Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci Biobehav Rev* 21:151-166
- Kato H, Kogure K, Araki T, Liu XH, Kato K, Itoyama Y (1995) Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the hippocampus following ischemia in a gerbil model of ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:60-70
- Kawamata T, Alexis NE, Dietrich WD, Finklestein SP (1996) Intracisternal basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:542-547
- Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, Clair DKS, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP (1998) Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 18:687-697
- Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PK (1991) Attenuation of focal cerebral ischemia injury in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11158-11162
- Kistler JP, Ropper AA, Martin JB (1991) Cerebrovascular disease. In: Harrison's principles of internal medicine (Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK, eds), New York, McGraw-Hill, Inc., pp 1977-2002
- Knight JA (1997) Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann Clin Lab Sci* 27:11-25
- Kondo T, Kinouchi H, Kawase M, Yoshimoto T (1996a) Astroglial cells inhibit the increasing permeability of brain endothelial cell monolayer following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Lett* 208:101-104
- Kondo T, Kinouchi H, Kawase M, Yoshimoto T (1996b) Differential response in the release of hydrogen peroxide between astroglial cells and endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Lett* 215:103-106
- Kong XJ, Fanburg BL (1992) Regulation of Cu,Zn-superoxide dismutase in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol* 153:491-497
- Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257:5751-5754
- Koroshetz WJ, Moskowitz MA (1996) Emerging treatments for stroke in humans. *TIPS* 17:227-233
- Kühl RJ (1996) Superoxid-Dismutase vom Mangan-Typ als Autoantigen bei akuter Epstein-Barr Virus Infektion, Göttingen, Cuvillier
- Kuhn T (1988) Die Struktur wissenschaftlicher Revolutionen, Frankfurt/M., Suhrkamp
- Kumar M, Liu GJ, Floyd RA, Grammas P (1996) Anoxic injury of endothelial cells increases production

- of nitric oxide and hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 219:497-501
- Lan Q, Mercurius KO, Davies PF (1994) Stimulation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* 201:950-956
- Lander HM (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 11:118-124
- Laterra J, Indurri RR, Goldstein GW (1993) Plasminogen activation and astroglial-induced neural microvessel morphogenesis. In: *Frontiers in cerebral vascular biology: transport and its regulation* (Drewes LR, Betz AL, eds), New York, Plenum Press, pp 189-198
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9782-9787
- Liu XH, Kato H, Nakata N, Kogure K, Kato K (1993) An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in rat hippocampus after transient cerebral ischemia. *Brain Res* 625:29-37
- Löschmann PA, Schulz JB (1997) Degenerative Erkrankungen der Basalganglien. In: *Klinische Neurobiologie: Molekulare Pathogenese und Therapie von neurologischen Erkrankungen* (Herdegen T, Tölle TR, Bähr M, eds), Heidelberg, Spektrum, pp 245-280
- Lucius R, Sievers J (1996) Postnatal retinal ganglion cells in vitro: protection against reactive oxygen species (ROS)-induced axonal degeneration by cocultured astrocytes. *Brain Res* 743:56-62
- Lum H, Barr DA, Shaffer JR, Gordon RJ, Ezrin AM, Malik AB (1992) Reoxygenation of endothelial cells increases permeability by oxidant-dependent mechanisms. *Circ Res* 70:991-998
- Marklund SL (1990) Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem J* 266:213-219
- Martz D, Rayos G, Schielke GP, Betz AL (1989) Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 20:488-494
- Matsuyama T (1996) Free radical-mediated cerebral damage after hypoxia/ischemia and stroke. In: *Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia* (Horst GJT, Korf J, eds), Totowa, NJ, Humana Press, pp 153-184
- Mattson MP (1997) Mother's legacy: mitochondrial DNA mutations and Alzheimer's disease. *TINS* 20:373-375
- Mertsch K, Grune T, Siems WG, Ladhoff A, Saupe N, Blasig IE (1995) Hypoxia and reoxygenation of brain endothelial cells in vitro: a comparison of biochemical and morphological response. *Cell Molec Biol* 41:243-253
- Mertsch K, Haseloff R, Blasig IE (1997) Investigations of radical scavengers by using an in vitro model of blood-brain barrier. In: *Animal alternatives, welfare and ethics* (van Zutphen LFM, Balls M, eds), Amsterdam, Elsevier, pp 881-886
- Michiels C, Arnould T, Houbion A, Remacle J (1992) Human umbilical vein endothelial cells submitted to hypoxia-reoxygenation in vitro: implication of free radicals, xanthine oxidase, and energy deficiency. *J Cell Physiol* 153:53-61
- Moreno S, Mugnaini E, Cerù MP (1995) Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem* 43:1253-1267
- Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogiwara T (1997) In vivo transfection of cis element 'decoy' against nuclear factor- $\kappa$ B binding site prevents myocardial infarction. *Nature Med* 3:894-899
- Müller JM, Rupec RA, Baeuerle PA (1997) Study of gene regulation by NF- $\kappa$ B and AP1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods: Comp Meth Enzymol* 11:301-312
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *New Engl J Med* 333:1581-1587



- Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM (1997) TNF- $\alpha$  pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:483-490
- Nishida S, Akai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kusunoki T, Suzuki K, Taniguchi N, Hashimoto S, Tamura TT (1993) Manganese superoxide dismutase content and localization in human thyroid tumours. *J Pathol* 169:341-345
- Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, Kamada T (1992) Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res* 599:246-252
- Ohtsuki T, Ruetzler CA, Tasaki K, Hallenbeck JM (1996) Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1137-1142
- O'Neill LAJ, Kaltschmidt C (1997) NF- $\kappa$ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *TINS* 20:252-258
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-169
- Panfili E, Sandri G, Ernster L (1991) Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. *FEBS Lett* 290:35-37
- Pardridge WM (1991) *Peptide Drug Delivery to the Brain*. New York, Raven Press
- Pennypacker K (1997) Transcription factors in brain injury. *Histol Histopathol* 12:1125-1133
- Pinteaux E, Copin JC, Ledig M, Tholey G (1996) Modulation of oxygen-radical-scavenging enzymes by oxidative stress in primary cultures of rat astroglial cells. *Dev Neurosci* 18:397-404
- Plateel M, Dehouck MP, Torpier G, Cecchelli R, Teissier E (1995) Hypoxia increases the susceptibility to oxidant stress and the permeability of the blood-brain barrier endothelial cell monolayer. *J Neurochem* 65:2138-2145
- Poeck K (1990) *Neurologie*, Berlin, Springer
- Poss WB, Huecksteadt TP, Panus PC, Freeman BA, Hoidal JR (1996) Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia. *Am J Physiol* 270:L941-L946
- Price JM, Sutton ET, Hellermann A, Thomas T (1997)  $\beta$ -Amyloid induces cerebrovascular endothelial dysfunction in the rat brain. *Neurol Res* 19:534-538
- Rabin O, Piciotti M, Drieu K, Bourre JM, Roux F (1996) Effect of anoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities in immortalized brain endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 32:221-224
- Raff T, van der Giet M, Endemann D, Wiederhold T, Paul M (1997) Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *BioTechniques* 23:456-460
- Raub TJ (1996) Signal transduction and glial cell modulation of cultured brain microvessel endothelial cell tight junctions. *Am J Physiol* 271:C495-C503
- Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourre JM, Strosberg AD, Couraud PO (1994) Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol* 159:101-113
- Ryan M, Rhoney DH, Luer MS, Hatton J (1997) New and investigational treatment options for ischemic stroke. *Pharmacotherapy* 17:959-969
- Saito K, Suyama K, Nishida K, Sei Y, Basile AS (1996) Early increases in TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neurosci Lett* 206:149-152
- Salminen A, Liu PK, Hsu CY (1995) Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 212:939-944
- Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C, Davies KJA (1990) Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J Biol Chem*

265:11919-11927

- Sato Y, Murphy PR, Sato R, Friesen HG (1989) Fibroblast growth factor release by bovine endothelial cells and human astrocytoma cells in culture is density dependent. *Molec Endocrinol* 3:744-748
- Schmedtje JF, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS (1997) Hypoxia induces Cyclooxygenase-2 via the NF- $\kappa$ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 272:601-608
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17: 6419
- Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Umahara T, Kawanami T, Asayama K (1995) Cerebellar superoxide dismutase expression in Menke's kinky hair disease: an immunohistochemical investigation. *Acta Neuropathol* 90:198-202
- Shukla A, Dikshit M, Srimal RC (1995) Status of antioxidants in brain microvessels of monkey and rat. *Free Radic Res* 22:303-308
- Siesjö BK, Katsura KI, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K, Siesjö P, Smith ML (1995) Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *J Neurotrauma* 12:943-956
- Sinet PM, Garber P (1981) Inactivation of the human CuZn superoxide dismutase during exposure to O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Arch Biochem Biophys* 212:411-416
- Stannes KA, Guatteo E, Janigro D (1996) A dynamic model of the blood-brain barrier 'in vitro'. *Neurotoxic* 17:481-496
- Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E (1995) Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 15:4738-4747
- Sun D, Lytle C, O'Donnell ME (1997) IL-6 secreted by astroglial cells regulates Na-K-Cl cotransport in brain microvessel endothelial cells. *Am J Physiol* 272:C1829-C1835
- Suttle NF (1986) Copper deficiency in ruminants; recent developments. *Vet Rec* 119:519-522
- Suzuki YJ, Packer L (1993) Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by vitamin E derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 193:277-283
- Takeda Y, Hashimoto H, Kosaka F, Hirakawa M, Inoue M (1993) Albumin-binding superoxide dismutase with a prolonged half-life reduces reperfusion brain injury. *Am J Physiol* 264:H1708-H1715
- Takemoto H, Kaneda K, Hosokawa M, Ide M, Fukushima H (1994) Conditioned media of glial cell lines induce alkaline phosphatase activity in cultured artery endothelial cells. *FEBS Lett* 350:99-103
- Terada LS, Willingham IR, Rosandich ME, Leff JA, Kindt GW, Repine JE (1991) Generation of superoxide anion by brain endothelial cell xanthine oxidase. *J Cell Physiol* 148:191-196
- Terada LS (1996) Hypoxia-reoxygenation increases O<sub>2</sub><sup>-</sup> efflux which injures endothelial cells by an extracellular mechanism. *Am J Physiol* 270:H945-H950
- Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW (1990) Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. *J Biol Chem* 265:454-461
- Tontsch U, Bauer HC (1991) Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured endothelial cells. *Brain Res* 539:247-253
- Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA (1996) Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: Cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10417-10422
- Uno H, Matsuyama T, Akita H, Nishimura H, Sugita M (1997) Induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:491-499

- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Meth Enzymol* 252:38-53
- Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA (1998) Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature Med* 4:228-231
- Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispé JR (1996) Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol* 271:L150-L158
- Wong GHW, Goeddel DV (1988) Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242:941-943
- Wong GHW (1995) Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial SOD. *Biochim Biophys Acta* 1271:205-209
- Wong S, Knight J, Hopfer S, Zaharia O, Leach C and Sunderman FW (1987) Lipoperoxides in plasma measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 33:214-220
- Yamamoto Y, Takahashi K (1993) Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys* 305:541-545
- Yang CS, Lin NN, Tsai PJ, Liu L, Kuo JS (1996) In vivo evidence of hydroxyl radical formation induced by elevation of extracellular glutamate after cerebral ischemia in the cortex of anesthetized rats. *Free Radic Biol Med* 20:245-250
- Yang W, de Bono DP (1997) A new role for vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factors: increasing endothelial resistance to oxidative stress. *FEBS Lett* 403:139-142
- Yoshimoto T, Houkin K, Tada M, Abe H (1997) Induction of cytokines, chemokines and adhesion molecule mRNA in a rat forebrain reperfusion model. *Acta Neuropathol* 93:154-158
- Yu ACH, Lee YL, Fu WY, Eng LF (1995) Gene expression in astrocytes during and after ischemia. *Progress Brain Res* 105:245-253
- Zuckerman SL, Mirro R, Armstead WM, Shibata M, Leffler CW (1994) Indomethacin reduces ischemia-induced alteration of blood-brain barrier transport in piglets. *Am J Physiol* 266:H2198-H2203
- Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Luty GA (1994) Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem* 269:24156-24162

**Danksagung**

Für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe 'Zellphysiologie' des Forschungsinstitutes für Molekulare Pharmakologie, die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung möchte ich Herrn PD Dr. I. E. Blasig herzlich danken.

Herrn PD Dr. U. Dirnagl danke ich für die sehr gute Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs 'Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz bildgebender Verfahren'.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe 'Zellphysiologie', Frau Dr. K. Mertsch, Herrn Dr. R. Haseloff, Frau A. Sporbert, Frau G. Hartmann sowie Frau B. Eilemann danke ich für die gute Zusammenarbeit und freundliche Hilfestellung im Labor.

Im besonderen danke ich Frau Margarethe Wahl für ihre Unterstützung.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertation ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und daß die Dissertation noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Matthias Schroeter

## Lebenslauf

Name Matthias Leopold Schroeter

Geburtsdatum 22.10.1965

Geburtsort Döbeln

Familienstand ledig

Staatsangehörigkeit deutsch

1972 - 1982 Polytechnische Oberschule in Döbeln und Berlin

1982 - 1984 Erweiterte Oberschule 'Gymnasium zum Grauen Kloster' in Berlin

1984 - 1985 Medizinisches Vorpraktikum in Berlin

1985 - 1987 Wehrdienst

1987 - 1993 Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin

1990 - 1991 Studium der Philosophie an der TU und FU Berlin

1992 Zwischenprüfung Philosophie, TU Berlin

1993 - 1994 Praktisches Jahr in Vellore, Tamil Nadu, Indien; in Berlin und Jerusalem, Israel

1994 Teilapprobation

1994 - 1996 Arzt im Praktikum in der II. Allgemeinpsychiatrischen Abteilung des Königin-Elisabeth-Hospitals Berlin-Herzberge

1996 Vollapprobation als Arzt

1996 - dato Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Abteilung Signaltransduktion/Molekulare Medizin

1996 - dato Mitglied im Graduiertenkolleg 'Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz bildgebender Verfahren'

Berlin, den 06. 04. 1998

Matthias Schroeter

Teilaspekte der vorliegenden Arbeit wurden bisher in den folgenden Journalen publiziert bzw. auf den folgenden Kongressen vorgestellt:

M. L. Schroeter, K. Mertsch, I. E. Blasig: *Antioxidative defence mechanisms in an in vitro model of blood-brain barrier: possibilities for pharmacological interventions*, in: Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Supplement to Vol. 355, No. 4 (1997), R130

M. L. Schroeter, K. Mertsch, I. E. Blasig: *Synergistic effects between brain capillary endothelial cells and astrocytes in antioxidative defence during hypoxia/reoxygenation*, in: Abstracts der Konferenz 'Funktionen von Gliazellen', Bogensee (1997), S. 132

M. L. Schroeter, K. Mertsch, J. Lindenau, B. Wiesner, M. Wienrich, I. E. Blasig: *Interaction between brain endothelial cells and astrocytes concerning antioxidative defence system during hypoxia/reoxygenation*, in: Abstracts der 27. Jahrestagung der Society for Neuroscience, New Orleans, Vol. 23 (1997), S. 2270

M. L. Schroeter, K. Mertsch, H. Giese, S. Müller, A. Sporbert, B. Hickel, I. E. Blasig: *Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier*, in: J Cereb Blood Flow Metab, eingereicht

M. L. Schroeter, K. Mertsch, A. Sporbert, J. Lindenau, B. Wiesner, M. Ertelt, K. Asayama, I. E. Blasig: *Astrocytes induce manganese superoxide dismutase in brain capillary endothelial cells*, in Vorbereitung für: Glia

I. E. Blasig, R. Blasig, A. Sporbert, H. Giese, M. L. Schroeter, W.-E. Siems, M. Paul, R. F. Haseloff: *Blood-brain barrier properties, NO and oxy-radical metabolism in new lines of rat brain endothelial cells*, in: Abstracts der 27. Jahrestagung der Society for Neuroscience, New Orleans, Vol. 23 (1997), S. 30

R. Blasig, A. Sporbert, H. Giese, M. L. Schroeter, K. Mertsch, K. Neubert, I. Schimke, W.-E. Siems, I. E. Blasig: *Immortalization of brain capillary endothelial cells, metabolism of NO and reactive oxygen species*, Acta Histochem. (1998), im Druck

A. Sporbert, D. I. Utepbergenov, K. Mertsch, M. L. Schroeter, R. F. Haseloff, I. E. Blasig: *Posthypoxic generation of free radicals by cells forming blood-brain barrier causes regulatory responses*, in: Abstracts 3rd. Int. Colloquium on Cellular Signal Recognition and Transduction, Berlin (1997), P05

I. E. Blasig, A. Sporbert, D. I. Utepbergenov, M. L. Schroeter, K. Mertsch, R. F. Haseloff: *Mediators of hypoxia/inflammation and function of blood-brain barrier*, in: Abstracts 2nd Congress of the EACPT, Sattelite Symposium Clinical Pharmacology of P-Glycoprotein and Related Transporters, Berlin (1997), S. 33

I. E. Blasig, A. Sporbert, D. I. Utepbergenov, M. L. Schroeter, K. Mertsch, R. F. Haseloff: *Cytokine- and hypoxia-induced lipid peroxidation in astrocytes*, in: Int J Clin Pharm Therap 36 (2), 1998, 112-113

K. Mertsch, M. L. Schroeter, R. F. Haseloff, D. I. Utepbergenov, I. E. Blasig: *Pharmacological interventions in an in vitro model of blood-brain barrier using RBE4 and brain endothelial cells*, Symposium of the Physiological Society, UMDS (St Thomas's), London, 6.-8.11.1997

M. L. Schroeter, K. Mertsch, A. Sporbert, J. Lindenau, B. Wiesner, S. Mueller, M. Ertelt, I. E. Blasig: *MnSOD is induced in brain capillary endothelial cells by Cocultivation with astrocytes*, Symposium 'In vitro models for neuroprotective drug discovery', Magdeburg 24./25.2.1998